Untersuchungen zum Inaktivierungsmechanismus der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase aus Hefe

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Jutta Nauhaus
aus Heide/Holstein

1977

78 70

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0039

Untersuchungen zum Inaktivierungsmechanismus der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase aus Hefe

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Jutta Nauhaus
aus Heide/Holstein

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	15. Dezember 1977
Dekan:	Professor Dr. K.P.Hadeler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Zähner

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke und Herrn D. J. Neeff am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. D. Mecke für viele wertvolle Hinweise und Vorschläge sowie für die intensive Hilfe bei der Besprechung der Ergebnisse danken.
Herrn Dr. J. Neeff bin ich für seine Betreuung bei Planung, Durchführung und Diskussion der Untersuchungen zu Dank verpflichtet.
Für die tatkräftige Mithilfe bei vielen Versuchen danke ich Frau U. Heer.
Herrn Dr. H.J. Reinicke und Herrn W.H. Bierbaum vom zentralen Isotopenlabor der Universität Tübingen danke ich für die freundliche Überlassung der notwendigen Apparaturen.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
c-MDH	cytoplasmatische Malatdehydrogenase
m-MDH	mitochondriale Malatdehydrogenase
NADH	ß-Nicotinamid-adenin-dinukleotid, red. Form
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis 5-phenyloxazol
PPO	2,5-Diphenyloxazol

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Verwendete Chemikalien	6
2.2.	Methoden	9
2.2.1.	Verwendeter Organismus	9
2.2.2.	Nährmedien	9
2.2.2.1.	Nähragar	9
2.2.2.2.	Medium für die Optimalkultur	9
2.2.2.3.	Acetat-Medium für die Derepression	10
2.2.2.4.	Medium für die Inaktivierung	10
2.2.3.	Anzucht und Haltung der Zellen	10
2.2.3.1.	Dauerkultur	10
2.2.4.	Züchtung von Hefezellen unterschiedlicher Malatdehydrogenase-Aktivität	11
2.2.4.1.	Optimalkultur, Acetatkultur, Inaktivierungskultur	11
2.2.4.2.	Benennung der einzelnen Zellarten	12
2.2.4.3.	Probeentnahme während der Derepressions- und Inaktivierungskinetik	13
2.2.5.	Radioisotopenmarkierung	14
2.2.6.	Hefeaufschluß	15
2.2.7.	Proteinbestimmung	16
2.2.8.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	16
2.2.9.	Bestimmung der Substrate Äthanol und Glucose	17

2.2.10.	Methoden zur Reinigung der Malatdehydrogenase	17
2.2.10.1.	Salminsulfatfällung	17
2.2.10.2.	Ammoniumsulfat-Chromatographie an Celite	17
2.2.10.3.	Trennung und Reinigung der Isoenzyme durch Dextranblau-Sepharose 4B	18
2.2.11.	Konzentrierung und Stabilisierung der Isoenzyme	20
2.2.12.	Elektrophoretische Methoden	21
2.2.12.1.	Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	21
2.2.12.2.	SDS-Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	22
2.2.13.	Anfärbeverfahren	23
2.2.13.1.	Aktivitätsanfärbung der Malatdehydrogenase	23
2.2.13.2.	Proteinanfärbung nach der Elektrophorese	23
2.2.14.	Identifizierung der Radioaktivität im Gelstreifen	24
2.2.14.1.	Verbrennung der Gelstreifen im Verbrennungsautomaten	24
2.2.14.2.	Quellung der Gelproben mit Hilfe von NCS	25
2.2.15.	Präparation von Antiserum gegen das cytoplasmatische Isoenzym der Malatdehydrogenase	26
2.2.16.	Plattendiffusion	27
2.2.16.1.	Doppeldiffusionsmethode	27

2.2.15.2.	Färbemethode	28
2.2.17.	Antigen-Antikörper-Titration	29
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Die Derepression und die Inaktivierung	31
3.2.	Chromatographischer Nachweis der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase	36
3.3.	Reinigung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase	38
3.4.	Versuche zur Radioisotopenmarkierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase	44
3.5.	Radioisotopenmarkierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase	46
3.6.	Reinigung der radioaktiv markierten cytoplasmatischen Malatdehydrogenase über Affinitätschromatographie an Dextranblau-Sepharose	49
3.7.	Bestimmung des Reinheitsgrades mit Hilfe elektrophoretischer Methoden	54
3.8.	Bestimmung des Markierungsgrades der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase	56
3.9.	Antigen-Antikörper-Titration	58
3.9.1.	Spezifität und Titer der gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase gebildeten Antiseren	58
3.9.2.	Radioimmunassay	61
3.10.	Ausschluß einer Copräzipitation radioaktiv markierter Fremdproteine	64

3. 11.	Versuch eines immunologischen Nachweises eines inaktiven cytoplasmatischen Malatdehydrogenase-Proteins nach der glucose-abhängigen Inaktivierung	67
3.12.	Immuntitrationen von Rohextrakten gleicher Enzymaktivität	72
4.	Diskussion	76
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literaturverzeichnis	88

1. Einleitung

In verschiedenen Mikroorganismen wird eine Repression der Synthese einiger Enzyme beobachtet, wenn zu Zellen, die auf einer Kohlenstoffquelle aus C_2- oder C_3-Verbindungen wachsen, Glucose zugegeben wird. Diese Syntheseregulation wird nach SPIEGELMAN (101, 102) als "Glucose-Effekt" bezeichnet. Zum ersten Mal wurde dieser Effekt schon 1942 für Bakterien (21, 77, 78) und 1947 für Hefe (101,102) beschrieben. Da nicht Glucose selbst, sondern Katabolite von Glucose für die Repression der Enzymsynthese verantwortlich sind, prägten MAGASANIK et al. (67,83) und EPHRUSSI et al. (20) den Begriff "Katabolit-Repression". Einige der "Katabolit-Repression" unterworfene Enzyme (19, 21, 27, 33 ,107, 116) spielen eine Rolle in der Gluconeogenese: Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, Fructose-1,6-bisphosphatase und im Glyoxylatcyclus: Malatsynthase, Isocitratlyase, cytoplasmatische Malatdehydrogenase.
Da diese Enzyme das Entstehen von Metaboliten katalysieren, die die Hefezelle mit geringem Aufwand aus dem Metabolismus der Glucose erhalten kann, ist die "Katabolit-Repression" bei ausreichendem Angebot an Glucose im Rahmen der Zellökonomie sinnvoll (67).
Neben der Repression der Synthese einiger Enzyme wird ein weiterer glucose-abhängiger Regulationsmechanismus beschrieben. SPIEGELMAN und REINER (102) fanden, daß die

Zugabe von Glucose zu auf Galaktose gewachsenen Hefezellen nicht nur die Synthese des Galaktose metabolisierenden Systems "Galaktozymase" reprimiert, sondern dieses System sofort inaktiviert. In den folgenden Jahren wurden weitere Hefeenzyme entdeckt, die beim Wachstum auf Glucose inaktiviert werden: α-Glucosid-Permease (31, 93, 94), cytoplasmatische Malatdehydrogenase (25, 116, 117) Fructose-1,6-bisphosphatase (28, 29 , 37 , 38), Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (29, 30, 33) und Isopropylmalatsynthase (12).

Der Begriff "Katabolit-Inaktivierung" wird für den Mechanismus der glucose-abhängigen Inaktivierung bereits vorhandener Enzyme verwendet (49). Im Unterschied dazu bezieht sich der Begriff "Katabolit-Repression" auf die Hemmung der Synthese von Enzymen.

WITT et al. (116) untersuchten den Mechanismus der Inaktivierung am Beispiel der Malatdehydrogenase aus Saccharomyces cerevisiae. Sie beobachteten eine schnelle Abnahme der Malatdehydrogenase-Aktivität nach Zugabe von Glucose zu dereprimierten Zellen (Inaktivierung), die auf Acetat als Kohlenstoffquelle gewachsen waren. Es wurde gezeigt, daß nur die cytoplasmatische Enzymaktivität und nicht die mitochondriale der Regulation durch Glucose unterliegt (19, 25, 50, 117). Die Inaktivierung würde nur beim Stamm Saccharomyces beobachtet, nicht bei anderen Hefe-

spezies (18).

Die cytoplasmatische Malatdehydrogenase katalysiert einen Teilschritt des Glyoxylatzyklus. Durch Bereitstellung von Oxalacetat liefert die vom Enzym katalysierte Reaktion ein wichtiges Substrat für die Gluconeogenese. Neben der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase sind beim Wachstum der Zellen auf einem glucosefreien Medium die ebenfalls zum Glyoxylatzyklus gehörenden Enzyme Isocitratlyase und Malatsynthase sowie die für die Gluconeogenese wichtigen Enzyme Phosphoenolpyruvatcarboxykinase und Fructose-1,6-bisphosphatase dereprimiert. Während Isocitratlyase und Malatsynthase nach Glucosegabe nur reprimiert werden, beobachtet man bei den anderen Enzymen zusätzlich eine rasche Inaktivierung. Diese Inaktivierung ist physiologisch sinnvoll. Durch die Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase wird ein "futile cycle" mit der Phosphofructokinase, dem Schlüsselenzym der Glycolyse vermieden (91). Durch die Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase wird der Glyoxylatzyklus und die Bereitstellung von Oxalacetat für die Gluconeogenese unterbunden. Durch die Inaktivierung der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase wird die Verknüpfung des Glyoxylatzyklus mit der Gluconeogenese unterbrochen und ein "futile cycle" mit der Pyruvatkinase verhindert (30). Als physiologischer Nutzen der Inaktivierung wurde die schnelle Entfernung der

enzymatischen Aktivität dieser drei Enzyme postuliert, um keine für die Zelle schädlichen Reaktionswege entstehen zu lassen (30, 91, 104).

Da alle drei Enzyme ein weitgehend kongruentes Regulationsverhalten zeigen (55, 76), kann angenommen werden, daß sie von einem gemeinsamen Mechanismus reguliert werden.

In vivo Versuche mit Hemmstoffen der Proteinbiosynthese, mit auxotrophen Mutanten und Glucose-Analogen lieferten ebenso wie in vitro Versuche mit Metaboliten der Glycolyse keine eindeutigen Hinweise auf den Inaktivierungsmechanismus (19,25 , 79). Eine allosterische Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase kann ausgeschlossen werden, da die Inaktivierung in vivo und in vitro ein irreversibler Vorgang ist (18).

Aufgrund der Irreversibilität werden derzeit zwei Inaktivierungsmechanismen diskutiert:

1. eine kovalente chemische Modifikation
2. eine selektive Proteolyse.

Für die Malatdehydrogenase konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym in vitro durch physiologische Metabolite (Glycerinaldehyd-3-phosphat, Pyridoxalphosphat) irreversibel inaktiviert wird (79). Hierzu ist kein inaktivierendes Enzym notwendig. Da sehr hohe Metabolitkonzentrationen und hohe pH-Werte für die in vitro Inaktivierung notwendig waren, ist dieser Mechanismus vermutlich ohne biologische

Bedeutung. Die chemische Modifizierung bei den bisher bekannten Beispielen (z.B. Phosphorylase, Glutaminsynthetase) ist ein enzymkatalysierter und in vivo reversibler Mechanismus.

Für eine selektive Proteolyse gibt es derzeit nur indirekte Hinweise. Die Irreversibilität der Inaktivierung (18, 25, 30,117) und die hohe Sensitivität der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase gegenüber den Hefeproteasen A und B (55, 76, 79, 80) sprechen für einen proteolytischen Abbau.

Reinigung und Charakterisierung der Isoenzyme der Malatdehydrogenase durch HÄGELE ermöglichten die Anwendung immunologischer Methoden zur Untersuchung des Inaktivierungsmechanismus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war:

1. die Gewinnung spezifischer Antiseren
2. die Ausarbeitung eines Titrationsverfahrens und eines Radioimmunassays
3. der immunologische Nachweis der durch Glucose strukturell veränderten, enzymatisch inaktiven cytoplasmatischen Malatdehydrogenase, um dadurch einen Hinweis auf einen der Inaktivierungsmechanismen zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien

(2-^{14}C) Acetic acid Na-Salz	Amersham Buchler, Braunschweig
Adenosin Triphosphat	Boehringer, Mannheim
L-Äpfelsäure p.a., sowie Na-Salz	Roth, Karlsruhe
Albumin (Hühnerei, Rinderserum)	Serva, Heidelberg
Alkoholdehydrogenase (Hefe)	Boehringer, Mannheim
Aluminiumoxyd, Alcoa A-305 pract.	Serva, Heidelberg
Amidoschwarz 10 B, extra reinst	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat, p.a.	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan
Bacto Peptone	Difco Laboratories, Detroit, Michigan
Bromphenolblau, Na-Salz, reinst	Serva, Heidelberg
Celite ^{R}545, pract.	Serva, Heidelberg
Cellulose-Acetat-Folie CA 250/0	Schleicher & Schüll, Dassel
Coomassie brillant blue G-250, rein	Serva, Heidelberg
Dextranblau 2000	Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
3 (4,5-Dimethylthiazolyl-2-) 2,5-diphenyl tetrazoliumbromid ("MTT"), reinst	Serva, Heidelberg
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	E. Merck, Darmstadt

D(+)-Glucose•H_2O	E. Merck, Darmstadt
Glucose (Handelsname Cerelose 02001)	Maizena GmbH
Glucose-6-phosphatdehydrogenase aus Hefe	Boehringer, Mannheim
Glycin, p.a.	E. Merck, Darmstadt
Glycerin, doppelt dest.	E. Merck
Hexokinase aus Hefe	Boehringer, Mannheim
Hydrazinsulfat	E. Merck, Darmstadt
L-(U-^{14}C)Leucine	Amersham Buchler, Braunschweig
L-(U-^{14}C) Malic acid	Amersham Buchler, Braunschweig
Malt extract	Difco Laboratories, Detroit, Michigan
2-Mercaptoäthanol p.a.	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
N,N'-Methylenbisacrylamid ("Bis") reinst	Serva, Heidelberg
Na-Dodecylsulfat ("SDS")	E. Merck, Darmstadt
ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid di-Na-Salz, bzw. freie Säure	Boehringer, Mannheim
ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduzierte Form	Boehringer, Mannheim
ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat	Boehringer, Mannheim
Natriumacetat, H_2O-frei	E. Merck, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck, Darmstadt
NCS	Amersham, Searle Corporation
Oxalessigsäure, freie Säure	Boehringer, Mannheim
Phenazin Methosulfat, rein	Serva, Heidelberg

2-Phenyläthylamin für Szintillationsmessungen	W. Zinsser, Frankfurt
2,2'-p-Phenylen-bis 5-phenyloxazol für Szintillationsmessungen (POPOP)	E. Merck, Darmstadt
2,5-Diphenyloxazol für Szintillationsmessungen (PPO)	E. Merck, Darmstadt
Protosol	NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain
Salminsulfat	Roth, Karlsruhe
Semicarbazid-Hydrochlorid, p.a.	E. Merck, Darmstadt
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamid ("TEMED"), reinst	Serva, Heidelberg
Titriplex III (EDTA), p.a.	E. Merck, Darmstadt
Toluol p.a.	E. Merck, Darmstadt
Triäthanolamin-Hydrochlorid	Boehringer, Mannheim
Trichloressigsäure, krist.	E. Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan ("Tris"), p.a.	E. Merck, Darmstadt
Triton X-100, p.a. für Szintillationsmessungen	Serva, Heidelberg
Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit
Yeast Nitrogen Base w/o AS	Difco Laboratories, Detroit

Soweit nicht besonders aufgeführt, handelt es sich um analysenreine Chemikalien der Firma E. Merck, Darmstadt.
Die Dialyseschläuche waren von der Firma Visking (Vertrieb: Serva, Heidelberg) und Kalle AG, Wiesbaden.

2.2. Methoden

2.2.1. Verwendeter Organismus

Die in dieser Arbeit untersuchten Isoenzyme der Malatdehydrogenase (L-Malat:NAD Oxidoreductase, E.C.1.1.1.37) wurden aus Saccharomyces cerevisiae M_1 isoliert. Der Stamm Saccharomyces cerevisiae M_1 ist wahrscheinlich ein triploider Hefestamm, der freundlicherweise von Prof. W. DUNTZE (Ruhruniversität Bochum) zur Verfügung gestellt wurde. Der Stamm wurde früher von Prof. LINNANE isoliert. Er eignet sich besonders für die Untersuchungen der Derepression und Inaktivierung der Malatdehydrogenase.

2.2.2. Nährmedien

2.2.2.1. Nähragar (für die Schrägagarröhrchen und Platten)

1 % Yeast Extract
2 % Bacto Peptone
2 % D-Glucose
2 % Bacto-Agar

Die Substanzen wurden in dest. Wasser gelöst.

2.2.2.2. Medium für die Optimalkultur nach WICKERHAM (114)

0,3 % Yeast Extract
0,3 % Malt Extract
0,5 % Bacto Peptone
3,0 % D-Glucose

Die Substanzen wurden in dest. Wasser gelöst.

2.2.2.3. Acetatmedium für die Derepression

0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids

0,3 % Natriumacetat, H_2O-frei

Die Substanzen wurden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5 gelöst.

2.2.2.4. Medium für die Inaktivierung

1 % D-Glucose in

0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5

Die Nährmedien, Gefäße und Pipetten wurden im Autoklaven (Typ F 03, Fa. Fetegari, Italien) 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Die Kulturen wurden steril beimpft.

2.2.3. Anzucht und Haltung der Zellen

2.2.3.1. Dauerkultur: Schrägagarkultur, Plattenkultur, Subkultur

Im Schrägagarröhrchen (schmale Gläschen mit Schraubdeckelverschluß) wurde der Hefestamm Saccharomyces cerevisiae M_1 als Dauerkultur bei 4°C gehalten. Die Zusammensetzung des Agars für die Schrägagarröhrchen und die Platten ist unter 2.2.2.1. beschrieben. Von der Dauerkultur wurden Platten durch Ausstreichen mit einer Impföse bis zu Einzelkulturen überimpft, die alle 2 Monate erneuert wurden. Die Platten wurden 2 Tage bei 28°-30°C im Bruträum inkubiert und bei 4°C gelagert. Für die Subkultur,

die alle 14 Tage erneuert werden mußte, wurden mit Hilfe einer Impföse Hefezellen der Plattenkultur auf ein Optimalmedium überimpft. Der 500 ml Erlenmeyerkolben war mit 4 Schikanen versehen und enthielt 100 ml Optimalkultur (114). Der Kolben wurde 48 Stunden bei 28°C im Brutraum auf einem LAB Shaker (Rundschüttelmaschine, Typ LSR Modell Kürner, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) 100 U/min oder auf einem Wasserbadschüttler (Reziprokschüttelmaschine, Typ RW-650, Fa. New Brunswick Scientific, New Brunswick, New Jersey) 100 U/min bei 30°C Wasserbadtemperatur geschüttelt. Die Ausbeute der Hefezellen war auf dem Rundschüttler etwas besser, so daß alle weiteren Züchtungen auf dem Rundschüttler ausgeführt wurden. Die gezüchteten Zellen wurden im Kühlraum gelagert.

2.2.4. Züchtung von Hefezellen unterschiedlicher Malatdehydrogenase-Aktivitäten

2.2.4.1. Optimalkultur, Acetatkultur, Inaktivierungskultur

Als Inoculum für die Optimalkultur wurden 2 ml der Subkultur verwendet. Ein 5 l Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen, der 1 l Optimalkultur enthielt, wurde 12 Stunden bei 100 U/min bei 28°C im Brutraum auf einem LAB Shaker (Rundschüttler) geschüttelt. Die 4 Schikanen sorgten für eine gute Belüftung. Das Wachstum auf dem Optimalmedium wurde durch Trübungsmessung bei 578 nm im Eppendorf Photometer (Typ 1101M, Fa. Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) verfolgt.

Nach 12 Stunden wurden die Zellen, die noch in der logarithmischen Wachstumsphase waren, mit einer präparativen Kühlzentrifuge (Typ J-21B, Fa. Beckman Instr., München, oder Typ Sorvall RC-5, Fa. Sorvall Du Pont Instr., Newtown) bei 3000 x g 10 Minuten abzentrifugiert. Pro Liter Optimalkultur erhält man 15 - 20 g Feuchtgewicht Hefe. Die Zellen wurden mit H_2O resuspendiert und nochmals bei 3000 x g 10 Minuten abzentrifugiert. Nach der Waschung wurden 5 g Feuchtgewicht-Zellen in 1 l Acetatmedium suspendiert. Die Suspension wurde in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen 6 Stunden bei 28°C im Brutraum auf einem Rundschüttler bei 100 U/min geschüttelt. Während der Inkubation auf Acetatmedium vermehren sich die Hefezellen nicht mehr. Die nach 6 Stunden abzentrifugierten und gewaschenen Zellen wurden auf ein Inaktivierungsmedium mit 1 % Glucose umgesetzt. Die Inaktivierungskinetik wurde über einen Zeitraum von 90 Minuten verfolgt.

2.2.4.2. Benennung der einzelnen Zellarten

In den auf Optimalkultur gewachsenen Zellen ist die Malatdehydrogenase-Aktivität gering. In diesen Zellen ist die Synthese der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase reprimiert, diese Zellen werden daher kurz "reprimierte" Zellen genannt. Auf Acetat-Minimalmedium steigt die

spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase stark an, dieses ist auf die Neusynthese der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase zurückzuführen. Die Zellen werden als "dereprimierte" Zellen bezeichnet. Während der 90-minütigen Inkubation in gepufferter Glucose-Lösung nimmt die Malatdehydrogenase-Aktivität wieder ab. In diesen Zellen wird die cytoplasmatische Malatdehydrogenase inaktiviert, die Zellen werden kurz "inaktive" Zellen genannt.

2.2.4.3. Probenentnahme während der Derepressions- und Inaktivierungskinetik

Für die Derepressions- und Inaktivierungskinetik wurden Proben entnommen, sofort auf Eis gegossen oder in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 3000 x g 10 Minuten abzentrifugiert. Durch Abkühlung auf $0^{o}C$ wird die Derepression bzw. Inaktivierung fast augenblicklich gestoppt (18, 84). Die erhaltene Feuchthefe wurde mit Hilfe von Alcoa (siehe 2.2.6.) aufgeschlossen. Falls mehrere Kolben gleichzeitig für einen Versuch benötigt wurden, wurde immer ein aliquoter Teil je Kolben entnommen, um eine gleichmäßige Verteilung der einzelnen Hefezellen, besonders während der Isotopenmarkierung zu gewährleisten. Eine Derepression oder Inaktivierung erfolgte nur dann, wenn die Zellen frisch gezüchtet waren. Für den Zell-

aufschluß konnten die dereprimierten oder inaktivierten Zellproben einen Tag im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden oder einige Wochen im tiefgefrorenen Zustand. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, da mit dieser Methode die Zellwände zerstört werden.

2.2.5. Radioisotopenmarkierung

Dem Acetat-Minimalmedium wurden 10 µCi/l L-(U-^{14}C)Leucin zugesetzt, die Ausgangsmenge der Zerfälle/min betrug im Medium ca. 2,2 x 10^7 cpm/l. Um eine zu schnelle Aufnahme des ^{14}C-Leucins zu vermeiden, wurde dem Medium 2,5 mg nicht markiertes Leucin je Liter zugegeben. Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Proben erfolgte im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Typ Betazint BF 5000 System BF 511 A mit angeschlossenem Teletypschreiber Modell 33 ASR, Fa. Berthold, Wildbad). Der Quench-Effekt wurde durch die innere Standard-Methode bestimmt. Als Szintillator für die wässrigen Proben diente ein Triton-Toluol-Szintillator folgender Zusammensetzung:

350 ml Triton X-100

650 ml Toluol

3 g PPO

75 mg POPOP.

Die Zählausbeute betrug bei 10 µl - 1000 µl wässrigen Proben in 10 ml Szintillator 70 %.

C.C.C. Hefeaufschluß (59)

Die Hefezellen wurden mit ca. 3 Teilen Aluminiumoxid (Alcoa) versetzt und im Mörser zerrieben. Je kräftiger und ausdauernder gerieben wurde, desto höher waren die Ausbeuten der Malatdehydrogenase-Aktivität und der Proteinkonzentration. Anschließend wurde die Hefe-Alcoa-Mischung mit 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5 extrahiert. Die Zugabemenge richtete sich nach der gewünschten Enzymaktivität und Proteinkonzentration. Danach wurde in einer Kühlzentrifuge bei 25000 x g 10 Minuten abzentrifugiert und im Überstand die Malatdehydrogenase-Aktivität und die Proteinkonzentration bestimmt. Da beim einmaligen Aufschließen mit Alcoa nur ein Teil der Zellen aufgebrochen wurde, wurde mit dem Alcoa-Hefezellen-Zelltrümmer-Gemisch durch Zugabe von Alcoa ein zweiter Aufschluß vollzogen, der ebenfalls wieder abzentrifugiert wurde. Die Überstände wurden vereinigt und zur Malatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmung, Proteinmessung und für weitere Versuche im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.7. Proteinbestimmung

Im rohen Zellextrakt und in den ersten Schritten der Reinigung wurde der Proteingehalt der Proben ausschließlich nach der Methode von LOWRY et al. (66) bestimmt. Bei niederen Proteinkonzentrationen wurde die Bestimmung nach HEINZEL (46), modifiziert nach HEIL und ZILLLIG (44) durchgeführt. Diese Methode hat gegenüber der Folin-Methode den Vorteil, daß sie durch Mercaptoäthanol nicht gestört wird. Als Referenz diente für beide Methoden eine mit Rinderserumalbumin erstellte Eichkurve.

2.2.8. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Aktivität der Malatdehydrogenase wurde nach WITT et al. (116) in Anlehnung an die Methode von WOLFE und NEILANDS (118) in einem Eppendorf-Photometer mit angeschlossenem Kompensationsschreiber (Modell 6511, Fa. Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) und in thermostatisierten Küvetten bei 25°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. Mit Malat als Substrat wurde die Entstehung von NADH photometrisch bei 366 nm gemessen.
Die Enzymeinheiten sind in Units angegeben. 1 U (Unit) entspricht dem Umsatz von 1 /uMol NADH/min. Die spezi-

fische Aktivität ist definiert als Unit pro mg Protein. Der Extinktionskoeffizient des NADH bei 366 nm ist $3,3 \times 10^6$ cm^2/Mol.

2.2.9. Bestimmung der Substrate Äthanol und Glucose

Der Verbrauch der Glucose (5) und die Produktion von Äthanol (6) während der Wachstumsphase der Hefe wurden nach BERGMEYER bestimmt.

2.2.10. Methoden zur Reinigung der Malatdehydrogenase

2.2.10.1. Salminsulfatfällung

Zur Abtrennung der Nukleinsäuren wurde dem aufgeschlossenen Rohextrakt Salminsulfatlösung zugesetzt. Pro 100 mg Protein wurden 15 mg Salminsulfat zugegeben, wobei 10 mg Salminsulfat in 1 ml H_2O gelöst waren. Diese Lösung wurde langsam unter Rühren im Kühlraum bei 4^oC dem Rohextrakt zugesetzt. Nach 1 Stunde Rühren wurde das unlösliche Material, d.h. die ausgefallenen Nukleinsäuren, durch Zentrifugation bei 25000 x g 10 Minuten lang abgetrennt; das Zentrifugat wurde verworfen.

2.2.10.2. Ammoniumsulfat-Chromatographie an Celite

Der Überstand der Salminsulfatfällung wurde bei 4^oC portionsweise unter Rühren mit Celite versetzt (Celite: Protein = 15:1) (58).

Anschließend wurde zu dieser Suspension langsam unter Rühren bei 4°C Ammoniumsufat bis zur 80 %igen Sättigung zugegeben. Das ausgefällte Protein wurde an die Celite-Partikel adsorbiert. Die Enzymlösung mußte mindestens 1 mg/ml Protein enthalten, da sonst bei der Ammoniumsulfat-Fällung ein zu feiner Niederschlag entstand, der nicht an Celite bindet.

Nach 2-stündigem Rühren wurde die Suspension in eine Säule gefüllt (Verhältnis Säulendurchmesser: Säulenhöhe = 1:3). Der Durchlauf war frei von Malatdehydrogenase-Aktivität. Nach dem Waschen mit mindestens einem Säulenvolumen 80 %iger Ammoniumsulfatlösung wurde mit einem fallenden Gradienten (80 % - 0 % Sättigung) eluiert. Es mußte ca. das zehnfache Volumen des Säulenvolumens als Gradient verwendet werden, um eine gute Isoenzymtrennung zu erreichen.

2.2.10.3. Trennung und Reinigung der Isoenzyme durch Dextranblau-Sepharose 4B

An CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde Dextranblau-2000 nach einer von HÄGELE (34) modifizierten Methode von RYAN und VESTLING gekoppelt (95). Nicht gebundenes Dextranblau wurde durch Waschen auf einer Chromatographiesäule mit 2 M KCl entfernt bis das Eluat farblos war.

Anschließend wurde mit 20 mM Tris HCl-Puffer pH 7,0 chloridfrei gewaschen und die Säule mit 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0, der 1 mM EDTA und 1 mM Mercaptoäthanol enthielt, äquilibriert.

Bei einer Säulendimension von 2 x 3 cm hatte die Säule ein Fassungsvermögen von ca. 1000 Units. Die Flußrate betrug 10 ml/h.

Nach Auftragung eines klaren Rohextraktes wurde die Säule zuerst mit einem 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0 und danach mit einem 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0 gewaschen. Beide Puffer enthielten wieder 1 mM EDTA und 1 mM Mercaptoäthanol.

Durch diese Behandlung konnte der größte Teil der Verunreinigung von der Säule gewaschen werden. Die Elution der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase erfolgte mit Hilfe einer Lösung von 2 mM NADH in 20 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 ("step"). Nach abermaligem Waschen mit 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 1 mM EDTA, 1mM Mercaptoäthanol pH 7,0 wurde die mitochondriale Malatdehydrogenase und der Rest der Verunreinigungen mit 0,5 M KCl von der Säule eluiert. Die Säule wurde anschließend mit einigen Säulenvolumina 2 M KCl gewaschen und in 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol pH 7,0, der zusätzlich mit 0,1 % Na-Azid versehen war, konser-

viert. Das Azid mußte vor der nächsten Säulenbenutzung gründlich entfernt werden, da es die Malatdehydrogenase inaktiviert.

2.2.11. Konzentrierung und Stabilisierung der Isoenzyme

Die Fraktionen mit Enzymaktivität wurden durch Ultrafiltration eingeengt. Bei Anwendung einer "Amicon-Zelle" (Zellvolumen 250 ml, Membranausschlußgrenze 10000, Druck 2 atü) war der Verlust der Malatdehydrogenase-Aktivität besonders beim cytoplasmatischen Enzym sehr hoch (40 %). Daher wurden andere Konzentrierungsverfahren erprobt. Mit Hilfe der Eintauchhülse von Millipore war der Aktivitätsverlust der Malatdehydrogenase am geringsten, 5 - 10 %.

Die Konzentrierung erfolgte über eine zylindrische, 11 cm^2 große Pellicon Molekularfiltrationsmembran und mit einer Wasserstrahlpumpe. Eine Hülse konnte ca. 100 ml Volumen filtrieren, für größere Mengen und schnellere Filtrationen wurden mehrere Hülsen miteinander verbunden. Die Konzentrierungsrate für eine Hülse beträgt 7 ml/h, die Membranausschlußgrenze ist 10000.

Da besonders die cytoplasmatische Malatdehydrogenase nicht sehr stabil ist, mußte sofort nach jedem Reinigungsschritt 100 mM Mercaptoäthanol als Oxidations-

schutz den Proben zugesetzt werden.

2.2.12. Elektrophoretische Methoden

Um den Reinheitsgrad und den Grad der Radioaktivitätsmarkierung der einzelnen Säulenschritte zu überprüfen, wurden SDS-Disk und Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen durchgeführt. Für die Elektrophoresen wurde das Plattengel-Elektrophoresegerät Ultra Phor (Fa. Colora Meßtechnik, Lorch) verwendet.

2.2.12.1. Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Elektrophoresen wurden nach dem System von DAVIS (15), ORNSTEIN (85) und MAURER (73) durchgeführt. Entsprechend der Ultra Phor Bedienungsanleitung (14) wurde jedoch ein 10-fach konzentrierter Elektrodenpuffer pH 8,3 verwendet, um den Spannungsabfall zwischen Elektroden und Gelenden gering zu halten (34).
Mit Hilfe des Taschenformers wurden für die Proben 20 Vertiefungen in das Sammelgel eingelassen, die nach Auspolymerisation des Geles mit 1:8 verdünntem Sammelgelpuffer gefüllt wurden. Das Trenngel enthielt 7,5 % Acrylamid. Die Enzymproben nach den verschiedenen Reinheitsschritten und die Referenzproteine wurden für die Geltaschen wie folgt vorbereitet: je nach Reinheitsgrad

sollten zwischen 50 /ug und 10 /ug Protein pro Tasche aufgegeben werden. Dazu wurden die Proben mit 1:8 verdünntem Sammelgelpuffer pH 8,3 verdünnt. Die Salzkonzentration der Proben sollte nicht höher als 100 mM sein. Konzentriertere Proben mußten gegen Sammelgelpuffer (1:8 verdünnt) dialysiert werden. Den Proben wurde vor der Aufgabe 20 % Glycerin, 0,002 % Bromphenolblau und 0,1 M Mercaptoäthanol zugesetzt.
Eine Geltasche faßte höchstens 70 /ul Probe. Das Bromphenolblau diente zur Markierung der Front, das Glycerin zum Unterschichten der Proben und das Mercaptoäthanol zur Stabilisierung. Die Apparatur wurde mit Hilfe eines Kryostaten auf 0°C gekühlt (Typ TK 300, Fa. mgw Lauda, Tauber). Die Elektrophorese wurde im Sammelgel bei einer Spannung von 100 Volt und im Trenngel bei 500 Volt durchgeführt.

2.2.12.2. SDS-Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die SDS-Disk-Gel-Elektrophorese wurde nach der Vorschrift von LAEMMLI (61) ausgeführt. Das System war mit dem der Disk-Elektrophorese (MAURER, 73) identisch, nur wurde dem Elektrodenpuffer, sowie der Gelmischung noch 10 % SDS zugesetzt. Die Acrylamid-Konzentration im Trenngel betrug 10 %. Ebenso wie bei der Disk-Gel-Elektrophorese wurden auch bei diesem Lauf 20 Taschen zur Aufnahme der

Proben vorbereitet. Diese Taschen wurden mit Sammelgelpuffer überschichtet, der 1:8 verdünnt war und 0,1 % SDS enthielt. Die Probenvorbereitung verlief wie unter 2.2.12.1. beschrieben.
Die Proben enthielten zusätzlich 0,1 % SDS und wurden in einem Eppendorf Thermostaten (Typ 3401, Fa. Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) 5 Minuten auf 95°C erhitzt.
Die abgekühlten Proben konnten mit Hilfe einer Eppendorfpipette, deren Spitze durch ein kurzes Schlauchstück verlängert war, in die Taschen pipettiert werden. Der Lauf wurde wie unter 2.2.12.1. beschrieben durchgeführt, jedoch bei 20°C.

2.2.13. Anfärbeverfahren

2.2.13.1. Aktivitätsanfärbung der Malatdehydrogenase

Die spezifische Aktivitätsanfärbung der Malatdehydrogenase zur Lokalisierung der Enzym-Aktivität im Gel erfolgte nach der von THORNE et al. (106) eingeführten Modifizierung der Vorschrift von WIENNE et al. (115).

2.2.13.2. Proteinanfärbung nach der Elektrophorese

Zur Lokalisierung der Proteine in Polyacrylamid-Gelen wurde eine Anfärbung mit Coomassieblau herangezogen (112, 113).

In einer Eisessig/Methanol/Wasser-Lösung wurden die proteinfreien Bereiche entfärbt.
Die Gelplatten wurden mit Hilfe einer selbstgebauten Geltrocknungsanlage unter Druck auf ein Filterpapier aufgezogen und so fixiert.

2.2.14. Identifizierung der Radioaktivität im Gelstreifen

Zur Auswertung der Radioaktivität im Gelstreifen wurden 2 verschiedene Methoden angewandt.

2.2.14.1. Verbrennung der Gelstreifen im Verbrennungsautomaten

Die Gelplatten wurden je nach Taschen- bzw. Probenverlauf in Streifen geschnitten und anschließend in 0,5 cm große Stücke zerteilt. Jedes Gelstückchen wurde in einer Polycarbonat-Kapsel mit Hilfe eines Verbrennungsautomaten (Oxymat IN 4101, Intertechnique) (System PETERSON, 89, 90) bei 700°C verbrannt. Ein CO_2-Absorber und ein Phenyläthylamin-Szintillator überführten die Radioaktivität der Proben in ein Szintillationsgläschen. Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer. Der Verbrennungsapparat besitzt eine Ausbeute von 70 - 90 %.

Zusammensetzung des ^{14}C-Szintillators:

330 ml Phenyläthylamin

220 ml Methanol

400 ml Toluol

70 ml H_2O

7 g PPO.

Nach ca. 10 Verbrennungen mußten zwei bis drei Leerverbrennungen und Waschungen durchgeführt werden.

Zusammensetzung der Waschflüssigkeit:

660 ml Methanol

340 ml Toluol.

2.2.14.2. Quellung der Gelproben mit Hilfe von NCS

WARD et al. (111) und die Herstellerfirma AMERSHAM BUCHLER (2) beschrieben eine zweite erfolgreiche Methode, um die Radioaktivität in Gelstücken zu messen. Die Gele wurden in 0,5 cm große Stücke zerschnitten und in folgender Szintillationsmischung gequollen:

5 ml Toluol-Szintillator bestehend aus 160 ml Liquiflor (NEN)/Gallone, d.h. 4 g PPO + 50 mg POPOP in 500 ml Toluol

0,1 ml 4 M Ammoniak

0,5 ml NCS.

Zwei Stunden nach Inkubation der Proben bei Raumtemperatur

unter leichtem Schütteln wurden die Szintillationsgläschen ins Dunkle und Kühle gestellt. Der Ammoniak im Szintillationsgemisch reduzierte die licht-induzierte Phosphoreszenz des NCS-Toluol-Szintillators. Die maximale Radioaktivität war nach 5 Tagen meßbar und blieb über die nächsten Tage konstant.
NCS ist eine Mischung aus quartemären Ammoniumverbindungen, die in Toluol gelöst sind.

2.2.1.5. Präparation von Antiserum gegen das cytoplasmatische Isoenzym der Malatdehydrogenase

Allen Kaninchen (von Bauern aus der Umgebung erworben) wurden vor der Immunisierung (Antigeninjektion) Kontrollserum entnommen.
Eine reine Enzympräparation der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase (HÄGELE) wurde in 0,9 % NaCl gelöst, dialysiert gegen 0,9 % NaCl-Lösung und auf 2 mg Protein/ml verdünnt. 0,5 ml solch einer Enzymprobe wurde mit dem gleichen Volumen komplettem Freunds Adjuvants homogenisiert und den Kaninchen intrakutan am Rücken injiziert.. Nach vier Wochen erhielten die Kaninchen auf dieselbe Art eine "Booster"-Injektion von 1 mg Enzymprotein/ml ohne Freunds Adjuvants und nach einer weiteren Woche

eine erneute Injektion von 1 mg Enzymprotein/ml. Nach 7 Tagen wurden zur Antikörpertiterbestimmung 10 ml Blut aus der Ohrvene entnommen.

Für die Serumgewinnung wurden die Kaninchen getötet und ausgeblutet. Das Blut blieb nach Abnahme 5 Stunden bei Raumtemperatur stehen, anschließend wurde es abzentrifugiert und abdekantiert. Der Blutkuchen wurde verworfen und das Antiserum mit einer Ultrazentrifuge (Modell L 5-65, Fa. Beckman Instr., München) bei 100000 x g 1 Stunde zentrifugiert, um Lipide und Zelltrümmer zu entfernen. Das Antiserum wurde bei -20°C eingefroren (110).

2.2.16. Plattendiffusion

2.2.16.1. Doppeldiffusionsmethode

Der Plattendiffusionstest wurde nach OUCHTERLONY (86, 87) und FEINBERG (23, 24) durchgeführt, der Plattenagar nach KABAT und MAYER (56) hergestellt.

1 % Agar wurde in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst, die 0,5 M Glycin und 1 % Na-Azid enthielt. Nach dem Autoklavieren wurde 15 ml Agarlösung in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 8,4 cm gegossen. Die Schichtdicke sollte 3 - 6 mm betragen. Nach Erkalten der Platte wurden mit einer Schablone um einen 6 mm großen Kreis 6 gleich große

Löcher ausgestanzt. In das zentrale Loch wurde das Antiserum pipettiert und in die äußeren das Antigen, d.h. der Rohextrakt oder angereicherte cytoplasmatische oder mitochondriale Malatdehydrogenase in einer Verdünnungsreihe von 1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32. Die Platten wurden 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend bei 4°C in einer feuchten Kammer 4 Wochen inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Präzipitationsbanden sichtbar. Nachdem die Antigenkonzentration für eine gute Präzipitation ermittelt war, wurden in den Agar statt Löcher Rinnen von einer Länge von 6 cm und einer Breite von 0,5 cm gestanzt. Der Abstand der Rinnen untereinander betrug 2 oder 3 cm. In die Vertiefungen wurden 200 µl Antiserum bzw. Antigen von einer bestimmten Konzentration pipettiert. Bei dieser Methode können größere Mengen eingesetzt und unspezifische Präzipitationen sichtbar gemacht werden.

2.2.16.2. Färbemethode

Die Platten wurden über 3 Tage mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Vor der Anfärbung wurden die Platten 1 Stunde mit H_2O gewässert, anschließend erfolgte die Überschichtung mit Färbelösung. Die Färbelösung enthielt 0,5 % Amidoschwarz in Methanol:Eisessig = 9:1. Die Färbelösung

wurde nach 1 Stunde entfernt und die proteinfreien Bereiche der Agarplatten mit Methanol:Eisessig = 9:1 entfärbt. Die Entfärbung durfte nicht zu lang sein, da sonst auch die Präzipitationsbanden ihre Blaufärbung verloren. Der Agar wurde auf Filterpapier aufgezogen und bildete nach der Trocknung einen dünnen Film.

2.2.17. Antigen-Antikörper-Titration

Die Rohextrakte und die Antiseren wurden vor der Titration in einer Ultrazentrifuge (Modell L 5-65, Fa. Beckman Instr., München) bei 100000 x g 60 Minuten zentrifugiert, um Lipide und ausgefallene Proteine zu entfernen. Für die Antigen-Antikörper-Titrationen wurde in einem Eppendorf-Gefäß zu konstanten Mengen Antigen unterschiedliche Mengen Antiserum pipettiert. Der Ansatz wurde durch Serumalbuminlösung (1 mg/ml) auf 1 ml gebracht. Die Inkubation verlief 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur und wurde über Nacht bei 4°C fortgesetzt. Anschließend wurden die Proben bei 12000 U/min in einer Eppendorf-Zentrifuge 4 Minuten zentrifugiert, um den Antigen-Antikörper-Komplex von der Lösung abzutrennen. 700 µl des Überstandes wurden vorsichtig mit einer Gilson-Pipette abgehoben und auf Malatdehydrogenase-Aktivität und bei

radioaktiv markierten Proben auf die Zerfälle pro Minute untersucht. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden alle Werte um das Volumen und um die Malatdehydrogenase-Aktivität des zugesetzten Antiserums korrigiert. Der Niederschlag wurde mit 700 µl einer 0,1 M NaCl und 0,1 % Triton X-100 enthaltenden Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach der vierten Waschung wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgehoben, auf Radioaktivität und Malatdehydrogenase-Aktivität getestet und verworfen. Das Käppchen des Eppendorfgefäßes wurde mitsamt dem Niederschlag abgeschnitten und in Triton-Toluol-Szintillator gebracht und die Radioaktivität des Präzipitats im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gezählt.

Andere Methoden wie z.B. ein Herauswaschen des Niederschlags aus dem Eppendorfgefäß durch Szintillator oder ein Lösen des Präzipitats in Protosol:Toluol:H_2O = 10:10:1 brachten keine abweichenden Ergebnisse.

3. Ergebnisse

3.1. Die Derepression und die Inaktivierung

Die Derepression und Inaktivierung der Malatdehydrogenase wurde zum ersten Mal 1966 (116) beschrieben. Auf Glucose gewachsene Zellen weisen eine niedrige Malatdehydrogenase-Aktivität auf, in acetat- oder äthanolgewachsenen Zellen ist eine hohe Malatdehydrogenase-Aktivität meßbar. WITT et al. (117), FERGUSON et al. (25) und DUNTZE et al. (19) wiesen nach, daß dieser Anstieg der Malatdehydrogenase-Aktivität der Synthese eines cytoplasmatisch lokalisierten Malatdehydrogenase-Isoenzyms zuzuschreiben ist. Setzt man dereprimierte Zellen auf glucosehaltiges Medium um, so wird die Synthese der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase nicht nur reprimiert, sondern das vorhandene cytoplasmatische Isoenzym auch inaktiviert.

Abb. 1 zeigt das Wachstum der Zellen, den Verlauf der Malatdehydrogenase-Aktivität, den Glucoseverbrauch und die Äthanolproduktion auf glucosegewachsener Zellen des Hefestammes Saccharomyces cerevisiae. Nach Erschöpfung des Zuckers dient Äthanol in der zweiten Wachstumsphase als Kohlenstoffquelle (Glucose-Äthanol-Diauxie, 74, 78). Die Aktivitäten der Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus und der Atmungskette steigen bei Wachstum der Zellen auf Glucose an (50). Die Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus: Isocitratlyase, Malatsynthase, Malatdehydrogenase und die der Gluconeogenese: Phosphoenol-

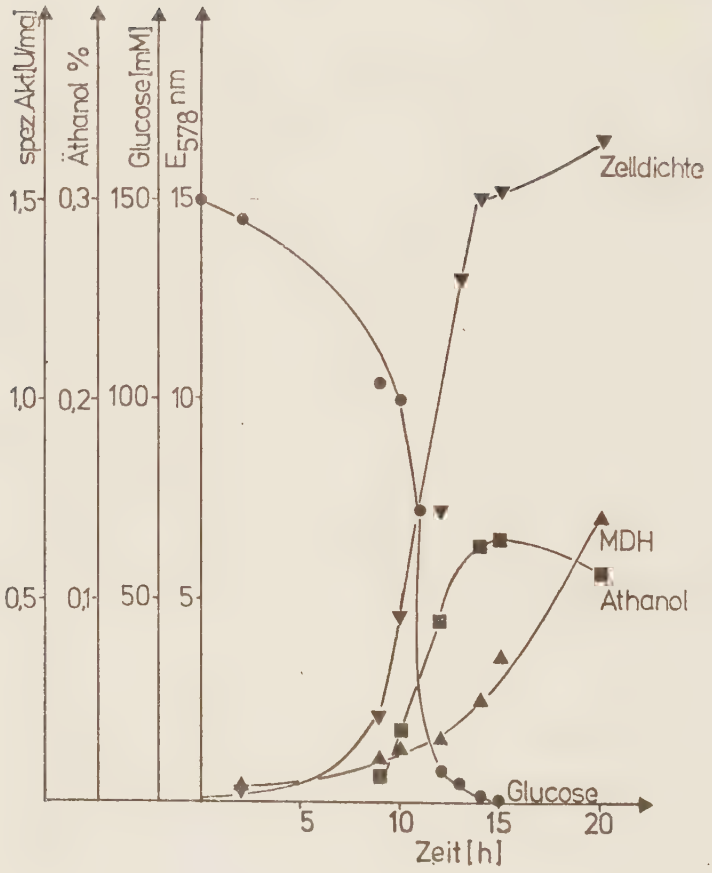

Abb. 1 Wachstum des Hefestammes Saccharomyces cerevisiae M_1 auf Optimalmedium

●—● Glucoseverbrauch
▼—▼ Zelldichte (Extinktion bei 578 nm)
■—■ Äthanolproduktion
▲—▲ spezifische Malatdehydrogenase-Aktivität

pyruvatcarboxykinase, Fructose-1,6-bisphosphatase werden erst meßbar, wenn eine C_2-Verbindung als Kohlenstoffquelle dient (27 , 33). Wie aus Abb. 1 hervorgeht, unterliegt die cytoplasmatische Malatdehydrogenase in der späten logarithmischen Wachstumsphase noch der Glucose-Repression. Zellen aus diesem Wachstumsabschnitt eignen sich zur Derepression auf Acetat- oder Äthanolmedium.

Nach Umsetzen der Zellen auf Acetatmedium (Abb. 2) steigt die spezifische Malatdehydrogenase-Aktivität rasch bis auf das ca. 9-fache des Ausgangswertes an. Da sich die spezifische Aktivität nach 6 Stunden nicht mehr merklich ändert, wird in allen weiteren Versuchen diese Derepressionszeit eingehalten. Die Länge der lag-Phase und die maximale spezifische Aktivität waren von Versuch zu Versuch gewissen Schwankungen unterworfen. Aus Abb. 2 ist zu ersehen, daß die spezifische Malatdehydrogenase-Aktivität nach Umsetzen der Zellen auf glucosehaltigen Kalium-Phosphat-Puffer innerhalb von 90 Minuten auf 18 % des Ausgangswertes zurückgeht. Diese Restaktivität wird nach WITT et al. (117) der mitochondrialen Malatdehydrogenase zugeordnet.

In Puffer erhöht sich die Zelldichte der Kulturen nicht weiter. Daher ist eine Ausverdünnung der Malatdehydrogenase-Aktivität durch Neusynthese anderer Proteine auszuschließen. FERGUSON et al. (25) beobachteten außerdem keine

Abgabe des Enzyms ins Medium, deshalb muß die Abnahme der spezifischen Aktivität der Malatdehydrogenase auf eine echte Inaktivierung zurückzuführen sein.

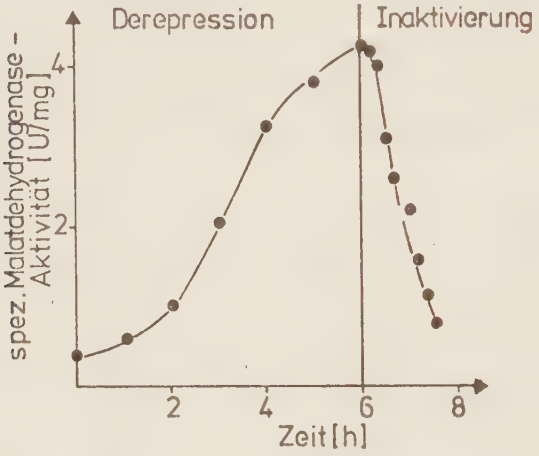

Abb. 2 Derepression der Malatdehydrogenase auf Acetat-Minimalmedium und Inaktivierung des Enzyms nach Umsetzen der Zellen auf Glucose-Puffer-Lösung

Versuchsdurchführung wie unter 2.2.4. beschrieben.

●—● spezifische Malatdehydrogenase-Aktivität

DUNTZE et al. (18) hatten in einer früheren Arbeit nach Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase und neuerlichem Umsetzen der Zellen auf ein acetathaltiges Minimalmedium einen sofortigen erneuten Anstieg der

Malatdehydrogenase-Aktivität beobachtet. Dies deutete auf einen schnellen Reaktivierungsprozeß hin.
In dem vorliegenden Experiment (Abb. 3) stieg die Aktivität der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase erst nach einer, der ersten Derepression vergleichbaren, Verzögerungsphase an. Wurden die Zellen auf Medium ohne Stickstoffquelle umgesetzt, so unterblieb die zweite Derepression. Der neuerliche Aktivitätsanstieg ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Neusynthese des Enzyms zurückzuführen.

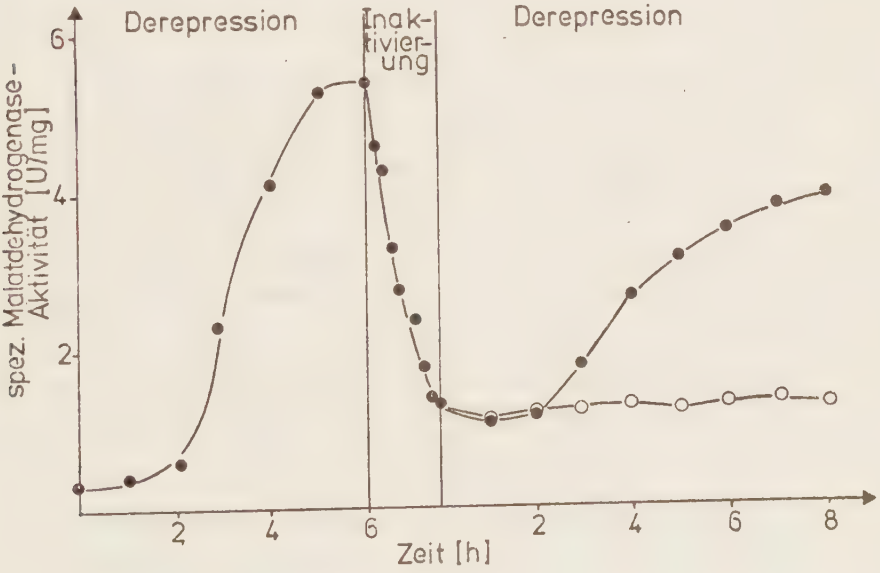

Abb.3 Derepression, Inaktivierung und erneute Derepression der Malatdehydrogenase
Die Zellen wurden wie unter 2.2.4. beschrieben dereprimiert, inaktiviert und erneut auf das selbe Derepressionsmedium bzw. Acetat-Puffer-Lösung umgesetzt.
●—● spezifische Malatdehydrogenase-Aktivität auf Acetat-Minimalmedium
○—○ spezifische Malatdehydrogenase-Aktivität auf Acetat-Kaliumphosphat-Puffer-Lösung

3.2. Chromatographischer Nachweis der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase

Unterwirft man Rohextrakte von Zellen unterschiedlicher Derepressions- und Inaktivierungsstadien einer umgekehrten Ammoniumsulfat-Gradientenelution an Celite (58), so läßt sich das Auftreten der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase kinetisch verfolgen (Abb. 4). Das chromatographische Verfahren trennt das mitochondriale (1. Peak) und das cytoplasmatische (2. Peak) Malatdehydrogenase-Isoenzym auf Grund unterschiedlicher Ammoniumsulfatlöslichkeit (32, 34, 53,117).

Die mitochondriale Malatdehydrogenase wird bei einer Ammoniumsulfat-Sättigung von 60 % und die cytoplasmatische von 40 % eluiert. Da die Rohextrakte vor Auftragung auf die Säule alle auf gleiche Proteinkonzentration eingestellt sind, kann in allen Stadien der Derepression und Inaktivierung der Gehalt der Zellen an mitochondrialem und cytoplasmatischem Iscenzym bestimmt werden. Abb. 4 zeigt, daß die Aktivität des mitochondrialen Isoenzyms über den Zeitraum der Derepression und Inaktivierung nahezu konstant bleibt. Nur die Aktivität des cytoplasmatischen Isoenzyms nimmt während der Derepression kontinuierlich zu und im Laufe der Inaktivierung rasch ab.

Infolge der hohen Reproduzierbarkeit des Elutionsverhaltens der beiden Isoenzyme konnte die Chromatographie

zum direkten Isoenzymnachweis verwendet werden (siehe 3.3.).

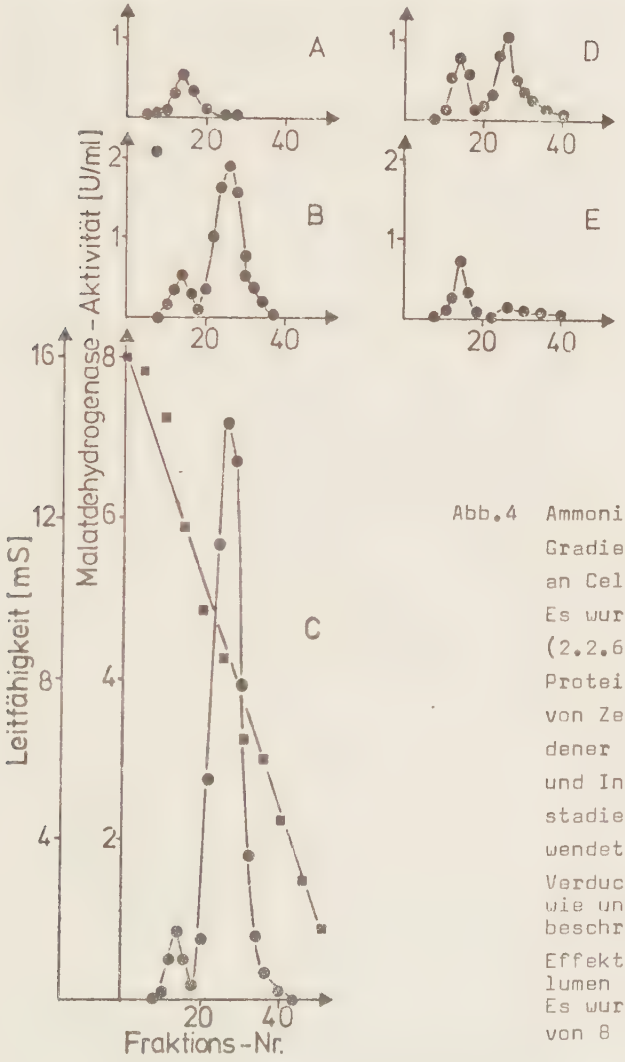

Abb.4 Ammoniumsulfat-Gradientenelution an Celite
Es wurden Rohextrakte (2.2.6.) gleicher Proteinkonzentration von Zellen verschiedener Derepressions- und Inaktivierungsstadien (2.2.4.) verwendet.
Verduchsdurchführung wie unter 2.2.1[illegible].2. beschrieben.
Effektives Säulenvolumen 2 x 6 cm.
Es wurden Fraktionen von 8 ml gesammelt.

A = 0 Std., B = 4 Std., C = 6 Std. Derepression
D = 40 Min., E = 90 Min. Inaktivierung

●—● Malatdehydrogenase-Aktivität
■—■ Leitfähigkeit

3.3. Reinigung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe eines Radioimmunassays zu untersuchen, ob ein inaktives cytoplasmatisches Malatdehydrogenase-Isoenzym in Zellen des Inaktivierungsmediums nachweisbar ist. Für diesen Zweck mußte die cytoplasmatische Malatdehydrogenase radioaktiv markiert und nach Reinigung ihr Markierungsgrad bestimmt werden.
Das Reinigungsverfahren für das markierte Enzym mußte zwei Forderungen erfüllen: zum einen sollte die Reinigung schnell durchzuführen sein, zum anderen sollten die Verluste möglichst gering sein, da radioaktiv markierte Zellen nur in kleineren Mengen zur Verfügung standen.
Mit Hilfe der Ammoniumsulfat-Chromatographie ließ sich zwar eine Trennung der Isoenzyme erzielen, der Reinigungsgrad war jedoch gering. Diese Methode konnte deshalb nicht verwendet werden. Am besten geeignet erschien ein affinitätschromatographisches Verfahren.
Zahlreiche neuere Arbeiten beschrieben die Reinigung von Enzymen mit Hilfe der Affinitätschromatographie über den Farbstoffliganden Cibachronblau F3G-A (3,10, 11, 60, 88, 95, 100, 105, 109). Für die Reinigung der Malatdehydrogenase war die Beobachtung von THOMPSON et al. (105) wichtig, daß dieses Enzym und andere ATP- und NAD(P)-abhängige Enzyme an Dextranblau-Sepharose adsorbiert und mit geringen Nukleotid-Konzentrationen wieder eluiert werden können. Die Autoren postulierten,

daß das Cibachronblau an der Coenzym-Bindungsstelle der Enzyme (der sogenannten "Dinukleotidfalte") gebunden wird. Bei der Suche nach einer effektiven präparativen Reinigungsmethode beider Malatdehydrogenase-Isoenzyme gelang E. HÄGELE (34) eine hohe Anreicherung der Enzyme mit Dextranblau-Polyacrylamid. Im Rahmen seiner Arbeit beobachtete er auch, daß die Trennung der Isoenzyme an Dextranblau-Sepharose mit Hilfe von NADH als spezifisches Elutionsmittel für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase möglich war. Diese Methode erfüllte die oben genannten Forderungen nach einer schnellen Isolierung des cytoplasmatischen Isoenzyms mit geringem Arbeitsaufwand und gleichzeitigem hohem Reinigungseffekt. Dieser Schritt wurde für die vorliegende Arbeit optimiert. Für ein charakteristisches und reproduzierbares Elutionsprofil mußte ein bestimmtes Verhältnis von Säulenvolumen zu aufgetragener Enzymmenge und eine geringe Flußrate eingehalten werden (siehe 2.2.10.3.). Mit Hilfe eines NADH-Gradienten von 0 - 6 mM NADH wurde die NADH-Konzentration bestimmt, die für die Elution ausreichend war. Das Maximum des cytoplasmatischen Isoenzym-Peaks lag bei 1,6 mM NADH. Mitochondriales Isoenzym war mit diesem NADH-Gradienten nicht von der Dextranblau-Sepharose-Säule abzulösen. Es wurde zusammen mit den übrigen säulengebundenen Proteinen mit 0,5 M KCl von der Säule eluiert.

Eine Ammoniumsulfat-Fraktionierung (siehe 2.2.10.2. und

3.2.) des NADH-Eluats und der KCl-Fraktion wies eindeutig nach, daß der NADH-Peak ausschließlich das cytoplasmatische Isoenzym und der KCl-Peak das mitochondriale enthielt.

In der Standardreinigung wurde die Säule mit Puffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die cytoplasmatische Malatdehydrogenase in einem "Step" mit 2 mM NADH eluiert. Die auf der Säule verbliebene mitochondriale Malatdehydrogenase und die restlichen Proteine wurden mit 0,5 M KCl von der Säule desorbiert. In Abb. 5 C ist eine Übersicht über die einzelnen Schritte der Säulenelution angegeben. Tabelle 1 zeigt die Reinigung beider Malatdehydrogenasen mit Hilfe der Dextranblau-Sepharose-Affinitätschromatographie.

Die in mehreren Schritten bis zur Homogenität gereinigte cytoplasmatische Malatdehydrogenase (HÄGELE) hatte eine spezifische Aktivität von 635 U/mg. Die "Ein-Schritt"-Reinigung an Dextranblau-Sepharose ermöglichte eine Anreicherung des cytoplasmatischen Isoenzyms auf 180 U/mg. In der Spitzenfraktion wurde sogar eine spezifische Aktivität von 300 U/mg gemessen. Das mitochondriale Isoenzym erreichte nur eine spezifische Aktivität von 9,5 U/mg, in der Spitzenfraktion von höchstens 15 U/mg.

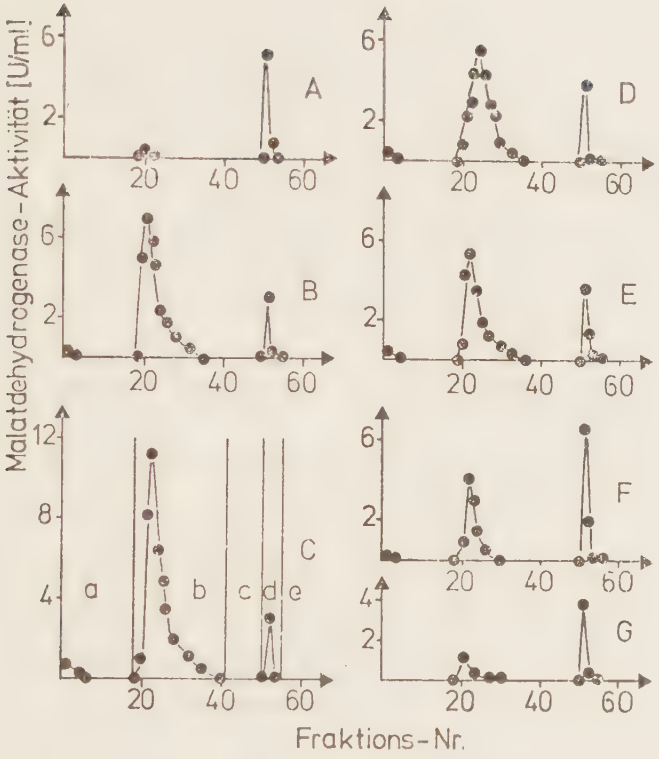

Abb. 5 Reinigung der Malatdehydrogenase-Isoenzyme an Dextranblau-Sepharose-Affinitätschromatographie

Es wurden Rohextrakte (2.2.6.) gleicher Proteinkonzentration von Zellen verschiedener Derepressions- und Inaktivierungsstadien (2.2.4.) verwendet. Versuchsdurchführung wie unter 2.3.10.3. beschrieben. Effektives Säulenvolumen 1 x 5 cm.
Es wurden Fraktionen von 4,4 ml gesammelt.
●—● Malatdehydrogenase-Aktivität

A = 0 Std., B = 4 Std., C = 6 Std. Derepression
D =10 Min., E =30 Min., F =60 Min., G =90 Min. Inaktivierung

Erklärung zu Abb. 5 C

Übersicht über die einzelnen Schritte der Säulenelution:

a Vorlauf und Waschung mit 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol pH 7,0 und anschließend mit 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol pH 7,0

b NADH-Schritt (c-MDH): 20 mM NADH in Puffer (20 mM Kalium-Phosphat, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol pH 7,0)

c Waschung mit 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol pH 7,0

d KCl-Schritt (m-MDH und Proteine): 0,5 M KCl in Puffer (20mM Kalium-Phosphat, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol pH 7,0)

e Waschung mit 2 M KCl in Puffer (20 mM Kalium-Phosphat, 1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoäthanol pH 7,0)

Das Isoenzymprofil der beiden Malatdehydrogenasen zu verschiedenen Zeitpunkten der Derepression und der Inaktivierung ließ sich mit Hilfe der Dextranblau-Sepharose-Affinitätschromatographie (siehe Abb. 5 A-G) ebenso zeigen, wie mit der Ammoniumsulfatchromatographie an Celite (Abb. 4 A-E).

Tabelle 1: Reinigung der cytoplasmatischen und mitochondrialen Malatdehydrogenase an Dextranblau-Sepharose

	Kennzahlen der auf die Säule aufgetragenen Rohextrakte				Kennzahlen der von der Säule eluierten Fraktionen				
					Vorlauf und Waschung	NADH-Schritt		KCl-Schritt	
	Aktiv. (U/ml)	Gesamt-aktiv. (U)	Protein (mg/ml)	spez. Aktiv. (U/mg)	Gesamt-aktiv. (U)	Gesamt-aktiv. (U)	spez-Aktiv.d. Spitzen-fraktion (U/mg)	Gesamt-aktiv. (U)	spez. Aktiv.d. Spitzen-fraktion (U/mg)
Derepression									
0 Std.	5,96	49,47	10	0,60	2,59	1,92	3	38,75	12,0
4 Std.	43,75	205,61	10	4,37	0,87	97,14	157	4,61	7,0
6 Std.	53,43	384,67	10	5,35	11,89	257,94	299	19,29	9,4
Inaktivierung									
10 Min.	44,59	312,17	10	4,46	2,56	151,22	220	16,66	15,5
30 Min.	38,78	275,36	10	3,88	4,20	139,92	160	21,39	15,1
60 Min.	16,57	140,58	10	1,66	4,31	53,62	140	38,91	12,0
90 Min.	0,95	80,81	10	0,95	4,04	10,81	57	18,53	10,0

3.4. Versuche zur Radioisotopenmarkierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase

Nachdem eine effektive Reinigungsmethode für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase gefunden war, wurde versucht, das cytoplasmatische Isoenzym während der Derepression radioaktiv zu markieren. Für die Reinigung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase, die Bestimmung des Markierungsgrades und die Immuntitrationen mußte genug Material zur Verfügung stehen. Das Angebot an Radioaktivität mußte so gehalten werden, daß einerseits der Meßfehler und andererseits die Radioaktivitätsmenge am Arbeitsplatz sowie der Kostenaufwand vertretbar waren.
Versuche, über Zugabe von ^{14}C-Na-Acetat oder ^{14}C-Malat die Zellen uniform zu markieren, waren erfolglos. Malat wurde von den Zellen als Kohlenstoff-Quelle nicht verwertet. Acetat (nicht radioaktiv markiert) mußte für eine ausreichende Derepression in hohen Konzentrationen (ca. 36 mM) angeboten werden. Da bei einem Vorversuch nur 5 % der eingesetzten Radioaktivitätsmenge in die Zellen eingebaut wurde, und Acetat nicht nur zur Proteinbildung sondern auch zur Synthese anderer Zellbestandteile verwendet wird, hätten zur hinreichenden Markierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase Radioisotopenmengen im mCi-Bereich eingesetzt werden müssen. Solche Größenordnungen waren aus finanziellen Gründen nicht möglich.

Ein bekanntes Verfahren ist die Proteinmarkierung durch Anbieten radioaktiver Aminosäuren. Asparagin und Leucin sind die am häufigsten in der Malatdehydrogenase vorkommenden Aminosäuren (34). Ein Molekül der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase (598 Aminosäuren) enthält 68 Reste Asparagin und 61 Reste Leucin. Zur Markierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase wurde Leucin eingesetzt, da es weniger metabolisiert wird als Asparagin. Dies konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, als versucht wurde die Kohlenstoff-Quelle Acetat des Derepressionsmediums durch Leucin zu ersetzen. Wie zu erwarten, wurde bei einem ausreichenden Angebot an Stickstoff Leucin nicht als Kohlenstoff-Quelle verwertet. In Vorversuchen konnte aber eine Abnahme der Radioaktivität im Medium gemessen werden, wenn ^{14}C-Leucin nicht als alleinige Kohlenstoff-Quelle diente. Zugabe von 0,01 mM - 0,02 mM nicht markiertem Leucin und konstanten Mengen ^{14}C-Leucin (10 µCi/l) zum Acetat-Minimalmedium führte zu einem optimalen Einbau. Es wurden 70 % - 90 % der Radioaktivität von den Zellen aufgenommen.

..5. Radioisotopenmarkierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase

Da sich nach den vorangegangenen Versuchen gezeigt hatte, daß ^{14}C-Leucin zur Radioisotopenmarkierung der Zellen gut geeignet ist, wurde der Einbau und Verbleib von ^{14}C-Leucin während der Derepression und Inaktivierung verfolgt (Abb.6). Das Acetat-Minimalmedium enthielt 10 /uCi/l = 0,03 /uM ^{14}C-Leucin und 2,5 mg/l = 0,019 mM nicht markiertes Leucin.

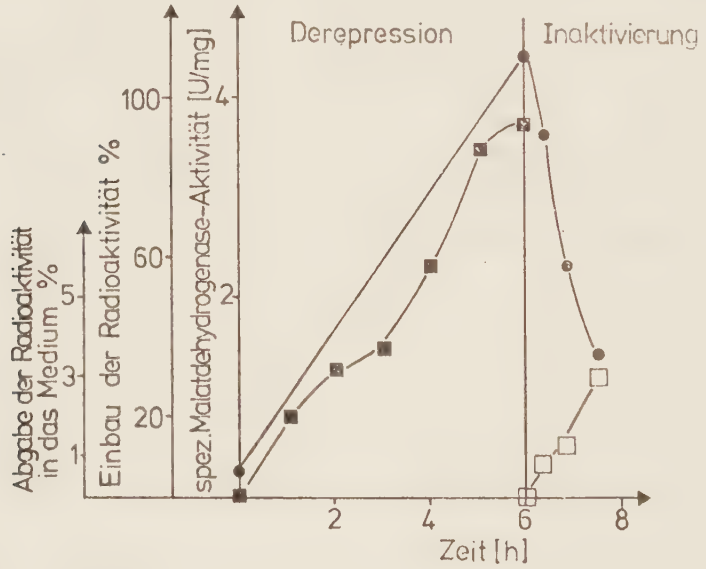

Abb.6 Derepression und Inaktivierung der Malatdehydrogenase während einer Inkubation der Zellen auf Acetat-Minimal-Medium bzw. Glucose-Puffer-Lösung

Versuchsdurchführung wie unter 2.2.4. und 2.2.5. beschrieben.

● — ● spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase
■ — ■ Einbau der Radioaktivität in die Zellen
□ — □ Abgabe der Radioaktivität in das Medium

Die Änderung der Enzymaktivität während der Derepression und Inaktvierung zeigt etwa denselben Verlauf wie unter 3.1. beschrieben. Während der Derepression wurde ein 15-facher Anstieg der Malatdehydrogenase-Aktivität erreicht. Im gleichen Zeitraum nahm die Radioaktivität im Medium von $1{,}9 \times 10^7$ cpm/l auf $1{,}1 \times 10^6$ cpm/l ab. In die Hefezellen wurde also 94 % der Radioaktivität eingebaut (Abb. 6).

Vor Umsetzen der Zellen auf Inaktivierungsmedium wurden die Zellen mehrmals gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr im Überstand zu messen war.

Im Laufe der Inaktivierung sank die Malatdehydrogenase-Aktivität auf 1/3 des Wertes, der bei Beendigung der Derepression erreicht war. Gleichzeitig konnten im Medium steigende Mengen von Radioaktivität gemessen werden.

Die Radioaktivitätsabgabe während der 90-minütigen Inaktivierung schwankte in verschiedenen Versuchen zwischen 3 % und 8 % der in die Zellen inkorporierten Radioaktivität. Diese Radioaktivitätsabgabe ins Medium während der Inaktivierung konnte nicht von einer partiellen Lyse der Hefezellen herrühren. Im Inaktivierungsmedium wurden nach Konzentrierung keine TCA-fällbaren Proteine nachgewiesen (22). Bei einer Lyse der Hefezellen müßten solche Proteine im Medium auftreten.

In Tabelle 2 ist die spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase und die Radioaktivität in verschiedenen Stadien

der Derepression und Inaktivierung angegeben. Eine Abnahme der proteingebundenen Radioaktivität während der Inaktivierung ist nicht eindeutig nachweisbar.
Aus dem unterschiedlichen Proteingehalt der Zellen auf Derepressions- und Inaktivierungsmedium kann geschlossen werden, daß sich die Zellen nach Umsetzen von einem Medium auf ein anderes verändern. Die Aufschlußmethode (Alcoa-aufschluß, siehe 2.2.6.) erfaßt nur noch ca. 70 % des Proteins der Zellen des Inaktivierungsmediums verglichen mit den Zellen des Derepressionsmediums.
Von der in die Zellen eingebauten Radioaktivität wird mit dieser Aufschlußart 23 % - 15 % erfaßt.

Tabelle 2 Derepression und Inaktivierung der Malatdehydrogenase

	spez. Aktiv. (U/mg)	Protein (mg/ml)	Radioaktiv. in den ganzen Zellen (cpm)	Gesamtradioaktiv. im Rohextrakt (cpm)	spez. Radioaktiv. (cpm/mg)
Derepression					
0 Std.	0,3	13,29	-	-	-
6 Std.	4,4	12,20	$17{,}9 \times 10^6$	$4{,}2 \times 10^6$	$2{,}4 \times 10^4$
Inaktivierung					
20 Min.	3,6	7,7	$17{,}7 \times 10^6$	$2{,}7 \times 10^6$	$2{,}3 \times 10^4$
50 Min.	2,3	9,1	$17{,}6 \times 10^6$	$3{,}1 \times 10^6$	$2{,}4 \times 10^4$
90 Min.	1,4	8,3	$17{,}4 \times 10^6$	$2{,}3 \times 10^6$	$1{,}8 \times 10^4$

3.4. Reinigung der radioaktiv markierten cytoplasmatischen Malatdehydrogenase über Affinitätschromatographie an Dextranblau-Sepharose

Die Reinigung der markierten cytoplasmatischen Malatdehydrogenase erfolgte wie unter 3.3. beschrieben über eine Affinitätschromatographie an Dextranblau-Sepharose. Die auf die Säule aufgetragenen gleichen Proteinmengen, die Dimensionen und die Elutionsgeschwindigkeiten entsprachen den Angaben unter 2.2.10.3.
Abb. 7 zeigt, daß schon beim Waschen der Säule mit Kalium-Phosphat-Puffer der größte Teil der Radioaktivität (71 %) mit den nicht gebundenen Proteinen von der Säule eluiert wir . Das cytoplasmatische Isoenzym wurde mit 2 mM NADH von der Säule abgelöst. Zur besseren Übersicht sind die Proteinkonzentrationen in den Eluaten in Abb. 7 nicht eingezeichnet. Die Konzentrationen schwankten zwischen 0,05 mg/ml und 0,02 mg/ml Protein. Die parallele Abnahme von Radioaktivität und cytoplasmatischer Malatdehydrogenase-Aktivität während der Inaktivierung läßt darauf schließen, daß während der Derepression ^{14}C-Leucin in das cytoplasmatische Isoenzym eingebaut worden ist. Da dieses in den folgenden Bestimmungen zum Markierungsgrad der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase bestätigt wurde, geht aus diesen Versuchen hervor,daß das postulierte inaktive Enzymprotein entweder nicht an der Säule gebunden wird

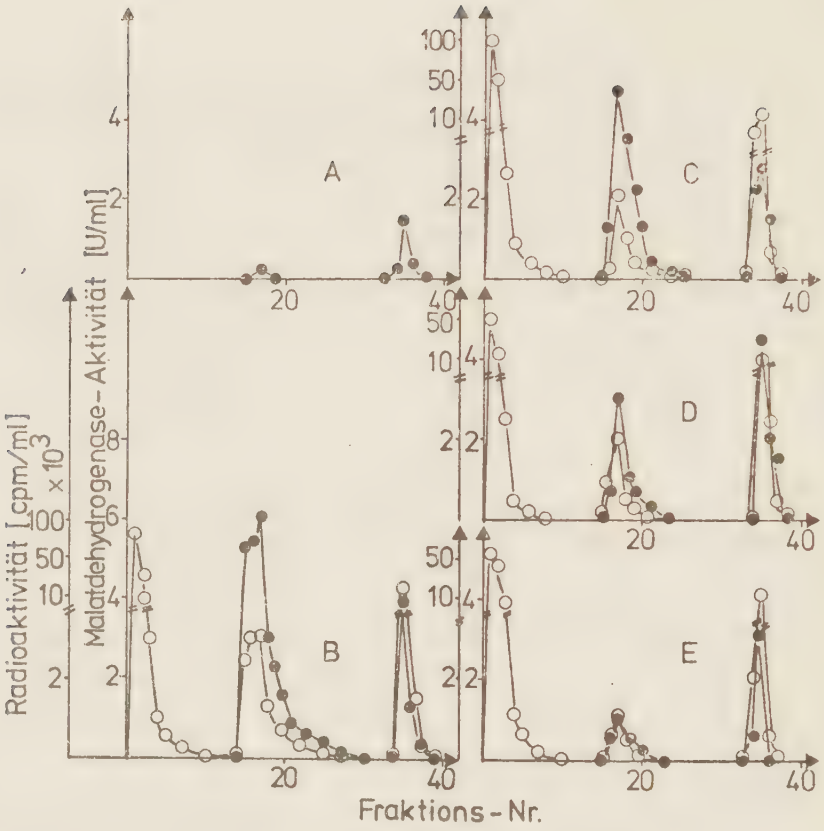

Abb.7 Reinigung der Malatdehydrogenase-Isoenzyme an Dextranblau-Sepharose-Affinitätschromatographie.

Es wurden Rohextrakte (2.2.6.) gleicher Proteinkonzentration von Zellen verschiedener Derepressions- und Inaktivierungsstadien (2.2.4.) verwendet. Versuchsdurchführung wie unter 2.2.10.3. beschrieben. Effektives Säulenvolumen 2 x 3 cm, es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt.

A = 0 Std., B = 6 Std. Derepression
C = 20 Min., D = 50 Min., E = 90 Min. Inaktivierung

●—● Malatdehydrogenase-Aktivität
○—○ Radioaktivität

Tabelle 3 Reinigung der cytoplasmatischen und mitochondrialen Malatdehydrogenase an Dextranblau-Sepharose

	Kennzahlen der auf die Säule aufgetragenen Rohextrakte			Kennzahlen der von der Säule eluierten Fraktionen											
				Durchlauf und Waschung			NADH-Schritt				KCl-Schritt			Ausbeute	
	Gesamtakt. (U)	spez. Akt. (U/mg)	Gesamtradioaktiv. (cpm)	Gesamtakt. (U)	Gesamtradioaktiv. (cpm)	%	Gesamtakt. (U)	%	Gesamtradioaktiv. (cpm)	%	Gesamtakt. (U)	%	Gesamtradioaktiv. (cpm)	%	Akt.	Radioakt.
Derepression																
0 Std.	119	35	-	-	-		07	6	-		10?	88	-		94	-
6 Std.	1480	440	84×10^5	-	59×10^5	71	1125	76	42×10^4	50	237	16	74×10^4	9	92	85
Inaktivierung																
20 Min.	1217	361	78×10^5	-	61×10^5	78	706	58	23×10^4	30	329	27	86×10^4	11	85	92
50 Min.	776	230	82×10^5	-	65×10^5	79	341	44	19×10^4	24	287	37	74×10^4	9	81	90
90 Min.	478	142	61×10^5	-	48×10^5	84	167	35	12×10^4	20	206	43	67×10^4	11	78	97

oder nicht an derselben Stelle wie das aktive Enzym eluiert wird.
Die mitochondriale Malatdehydrogenase und die restlichen Proteine wurden mit 0,5 M KCl eluiert.
Tabelle 3 zeigt die Anreicherung der beiden Isoenzyme mit Hilfe der Dextranblau-Sepharose-Affinitätschromatographie.

Für die weiteren Versuche wurden die vereinigten Fraktionen der cytoplasmatischen und die der mitochondrialen Malatdehydrogenase mit einer Millipore-Eintauchhülse eingeengt (siehe 2.2.11.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Zusammenstellung der in weiteren Versuchen verwendeten cytoplasmatischen und mitochondrialen Malatdehydrogenase-Präparationen

	c-MDH-"Pool"				
	Aktiv. (U/ml)	Protein (mg/ml)	spez. Aktiv. (U/mg)	Radio-aktiv. (cpm/ml)	spez. Radioaktiv. (cpm/mg)
Sedimentation					
6 Std.	42,8	0,25	170	$19,3 \times 10^3$	$7,7 \times 10^4$
Inaktivierung					
20 Min.	59,1	0,38	155	$5,5 \times 10^3$	$6,9 \times 10^4$
50 Min.	6,3	0,09	92	$4,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$
90 Min.	6,1	0,11	55	$2,0 \times 10^3$	$5,7 \times 10^4$

	m-MDH-"Pool"				
	Aktiv. (U/ml)	Protein (mg/ml)	spez. Aktiv. (U/mg)	Radio-aktiv. (cpm/ml)	spez. Radioaktiv. (cpm/mg)
Sedimentation					
6 Std.	9,13	0,61	15	$2,6 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$
Inaktivierung					
20 Min.	9,13	0,57	16	$3,2 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$
50 Min.	8,54	0,61	14	$3,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$
90 Min.	9,13	0,70	13	$3,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$

3.7. Bestimmung des Reinheitsgrades mit Hilfe elektrophoretischer Methoden

Mit Hilfe der Disk- und SDS-Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen waren Abschätzungen über den Reinheitsgrad der an Dextranblau-Sepharose angereicherten Isoenzyme zu erwarten.

Die Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (2.2.12.1.) gab einen Überblick über die Verteilung der Proteine. Diese Trennmethode ermöglichte mit Hilfe der spezifischen Aktivitätsanfärbung (2.2.13.1.) die Bestimmung der Position der Isoenzyme der Malatdehydrogenase.

Eine schärfere Trennung der Proteinbanden wurde über eine SDS-Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (2.2.12.2.) erhalten. Um durch Proteinanfärbung (2.2.13.2.) noch geringe Verunreinigungen sichtbar zu machen, mußten große Mengen angereicherter cytoplasmatischer Malatdehydrogenase aufgetragen werden. Dies führt zu einer Überladung der Malatdehydrogenase-Bande. Neben der deutlich sichtbaren Hauptbande sind noch mehrere nur schwach gefärbte Proteinbanden zu erkennen (Abb. 8). Die Hauptbande wurde durch Vergleich mit einer vollständig gereinigten Enzymprobe (von HÄGELE) als cytoplasmatische Malatdehydrogenase identifiziert. Die cytoplasmatische Malatdehydrogenase konnte elektrophoretisch als Bande von den Verunreinigungen scharf getrennt werden. Dies ermöglichte nach Zerschneiden des Gels

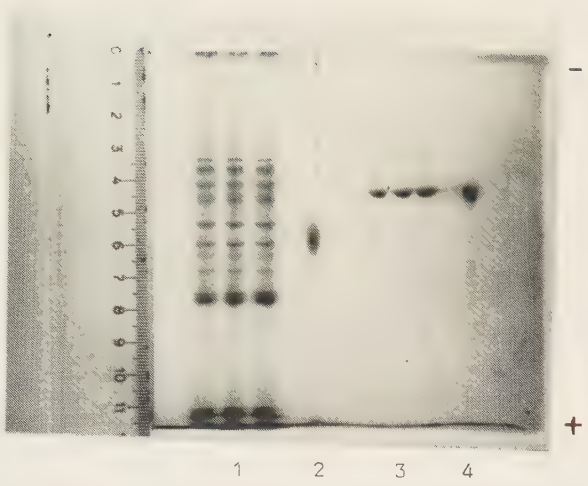

Abb. SDS-Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der angereicherten Isoenzym-Präparationen (nach 6 Std. Derepression)
Versuchsbedingungen wie unter 2.2.12.2. und 2.2.13.2. beschrieben.

1 m - MDH (KCl-Eluat)
2 reine m - MDH
3 c - MDH (NADH-Eluat)
4 reine c - MDH

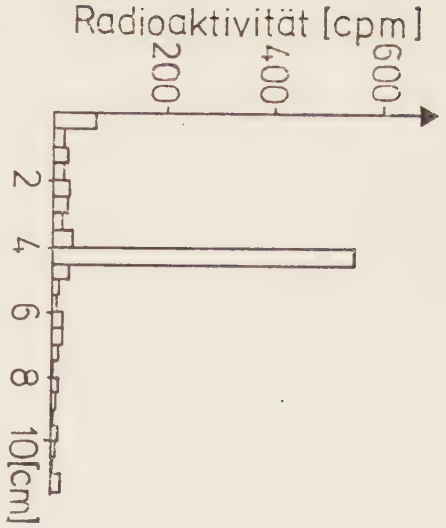

Abb.9 Radioaktivität in den Gelproben der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase nach Verbrennung im Oxymaten
Versuchsbedingungen wie unter 2.2.14.1. beschrieben.

die Bestimmung der in der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase enthaltenen Radioaktivität. Eine direkte Aussage zum Reinheitsgrad läßt sich nur schwer machen, da aus dem Anreicherungsfaktor nicht auf den Reinheitsgrad geschlossen werden kann. Abbildung 8 zeigt aber eine mindestens 50 %ige Reinheit des cytoplasmatischen Isoenzyms.

3.8. Bestimmung des Markierungsgrades der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase

Zur Bestimmung des Markierungsgrades wurde die cytoplasmatische Malatdehydrogenase aus Zellen nach 6 Stunden Derepression verwendet. Sie wurde gemäß den Angaben unter 3.6. angereichert. Die konzentrierten Proben wurden durch Verdünnen auf gleichen Proteingehalt gebracht und einer SDS-Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese unterworfen. Die Gele wurden nach dem Lauf zerteilt und im Verbrennungsapparat verbrannt (siehe 2.2.14.1.). Mit dieser Methode sollte die Radioaktivität den einzelnen Proteinbanden zugeordnet werden.
Von der Probe nach 6-stündiger Derepression wurden 2,6 Units und 1155 cpm auf das Gel aufgetragen. In der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase-Bande wurden 554,4 cpm (48 %) gemessen. Am Startpunkt lagen 90 cpm (8 %) der aufgetragenen Radioaktivität. Der Rest der Radioaktivität war über das ganze Gel verteilt und ließ sich keiner

weiteren Proteinbande zuordnen (Abb. 9).
Korrelation der in der Malatdehydrogenase-Bande gemessenen Radioaktivität mit der auf das Gel aufgetragenen Enzymaktivität ergab folgenden Markierungsgrad der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase:
1 Unit cytoplasmatische Malatdehydrogenase entspricht ca. 200 cpm.
Aus verschiedenen Versuchen ergab sich für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase ein Markierungsgrad, der zwischen 175 cpm und 234 cpm pro Aktivitätseinheit lag.
Um die mit dem Verbrennungsapparat gefundenen Markierungsgrade des cytoplasmatischen Isoenzyms abzusichern, wurden die Gele nach der Methode von WARD et al. (111) untersucht. Bei dieser Methode werden die zerschnittenen Gel-Proben mit NCS eluiert (siehe 2.2.14.2.) und im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gezählt.
Für beide Methoden zur Bestimmung des Markierungsgrades der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase standen Proben aus einem Elektrophoreselauf gleichartiger Gele zur Verfügung (siehe Abb. 8). Die 5 Tage in NCS-Liquiflor-Ammoniak gequollenen Gelproben ergaben denselben Markierungsgrad wie die Proben des Verbrennungsapparats.

3.9. Antigen-Antikörper-Titrationen

3.9.1. Spezifität und Titer der gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase gebildeten Antiseren

Die Herstellung von Antiseren gegen angereicherte Isoenzyme der Malatdehydrogenase aus Saccharomyces cerevisiae M_1 wurde zum ersten Mal von REGULA, JOX und GUZINSKI (92 , 53, 32) beschrieben. Titrationen von Malatdehydrogenase-Präparationen mit dem jeweiligen Antiserum führen zu sichtbarer Präzipitation. Die Malatdehydrogenase-Aktivität bleibt im Antigen-Antikörper-Komplex erhalten. Dieser kann durch Zentrifugation aus dem Ansatz entfernt werden. Durch die Immuntitrationen konnten Informationen über die Spezifität der Antiseren erhalten werden. Die Antiseren gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase waren spezifisch für dieses Isoenzym (Abb. 12 und 13). Die Antiseren gegen mitochondriale Malatdehydrogenase führten mit beiden Isoenzymen zur Präzipitation. Diese Unspezifität des Antiserums war nicht auf Verunreinigungen der Enzympräparationen, die für die Immunisierung der Tiere und für die Titrationen verwendet wurden, zurückzuführen (32,53).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antiseren gegen reine cytoplasmatische Malatdehydrogenase (HÄGELE) verwendet (siehe 2.2.15.).

Für die optimale Ausfällung des Antigen-Antikörper-Komplexes müssen Antigen und Antikörper in einem bestimmten

Mengenverhältnis vorhanden sein (Äquivalenzbereich der Heidelberger Kurve, 43). Die Titer gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase wurden mit dem Plattendiffusionstest nach OUCHTERLONY (86) bestimmt. Setzt man 50 /ul unverdünntes Antiserum gegen abnehmende Konzentrationen angereicherter cytoplasmatischer Malatdehydrogenase (1; 1:2; 1:4; 1:8; etc.), so wird ungefähr bis zu einer Verdünnung von 1:4 (0,12 U/ml) eine Präzipitation beobachtet (siehe Abb. 10).

Übereinstimmend mit den Angaben von JOX (53) und GUZINSKI (32) ergab das mitochondriale Isoenzym mit dem Antiserum gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase keine Präzipitationsbanden (Abb. 11).

Da der Plattendiffusionstest ergab, daß nur bei hohen Antiserum-Konzentrationen ein Enzym-Antikörper-Komplex präzipitiert wird, mußte für die folgenden Versuche das Antiserum unverdünnt verwendet werden. Die hier beschriebenen Experimente wurden mit Antiseren von verschiedenen Kaninchen durchgeführt. Da nur geringfügige Unterschiede im Titer auftraten, hat die Verwendung von Antiseren verschiedener Tiere keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse. Durch Variation der Immunisierungsmethoden ließ sich die Antikörperproduktion nicht erhöhen.

Folgende Abwandlungen wurden versucht:

a) Veränderung der Zeitabstände zwischen den Antigen-Injektionen

b) Injektionsarten (intramuskulär, intrakutan, zwischen die Zehen)

c) mit und ohne Zusatz von komplettem Freunds Adjuvants.

Der ungewöhnlich kleine Titer ist vermutlich auf eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Malatdehydrogenasen der Hefe Saccharomyces cerevisiae und der Kaninchen zurückzuführen.

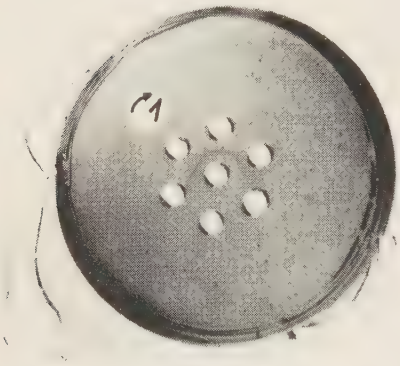

Abb. 10

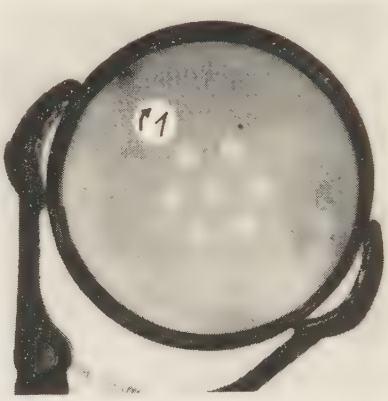

Abb. 11

Plattendiffusionstest nach OUCHTERLONY

in der Mitte Antiserum gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase
in den äußeren Vertiefungen Verdünnungsreihen (1;1:2;1:4;1:8 etc.)

der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase	der mitochondrialen Malatdehydrogenase

r1 Beginn der Verdünnungsreihe (Fortsetzung im Uhrzeigersinn)

3.9.2. Radioimmunassay

Der Plattendiffusionstest gab Auskunft über die Spezifität und den Titer des Antiserums. Ein inaktives Enzym-Protein konnte trotz höherer Enzym- und Antiserummenge (siehe 2.2.13.1.) nicht sichtbar gemacht werden.
Eine empfindlichere Methode zum Nachweis kleiner Antigenmengen ist der Radioimmunassay.
Zur Gewinnung radioaktiv markierter Malatdehydrogenase wurden auf Glucose gewachsene Zellen in ein Derepressionsmedium mit ^{14}C-Leucin umgesetzt. Aus Rohextrakten dieser "dereprimierten"Zellen wurden die Isoenzyme angereichert (siehe 3.6.).
Um ein direktes Maß für die präzipitierte Enzymaktivität und die im Präzipitat auftretende Radioaktivität zu erhalten, wurden die radioaktiv markierten, angereicherten Isoenzyme mit Antiserum gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase titriert. Es wurden Enzymaktivitäten von 1 U/ml verwendet. Diese Aktivität läßt sich mit einer vertretbaren Menge Antiserum titrieren. Gleichzeitig ist im Niederschlag eine auswertbare Radioaktivitätsmenge zu messen. Die Testansätze wurden durch Albuminlösung (1 mg/ml) auf ein konstantes Volumen von 1 ml gebracht. Die Albuminlösung stabilisiert die Aktivität der angereicherten Isoenzyme. In Abbildung 12 ist die Aktivität der radioaktiv markierten cytoplasmatischen Malatdehydrogenase im Überstand und die Radioaktivität im Nieder-

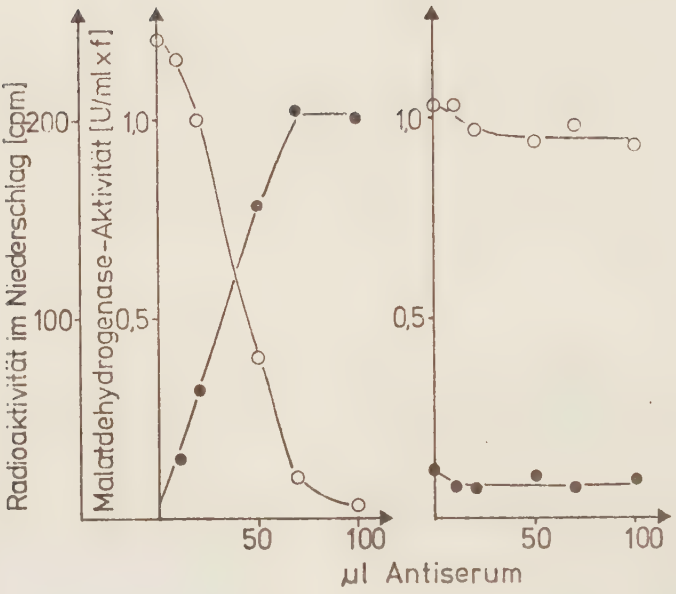

Abb. 12

^{14}C-markierter cytoplasmatischer Malatdehydrogenase

Abb. 13

^{14}C-markierter mitochondrialer Malatdehydrogenase

Titrationskurve bei konstanten Mengen und variablen Mengen Antiserum gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase

Versuchsdurchführung wie unter 2.2.17. beschrieben.

o—o Malatdehydrogenase-Aktivität im Überstand

●—● Radioaktivität im Niederschlag

schlag bei Zugabe von steigenden Mengen Antiserum dargestellt. Bei Zugabe von 70 µl Antiserum ist nach Zentrifugation nur noch eine geringe Enzymaktivität im Überstand meßbar. Weitere Zugaben von Antiserum führen zu keiner weitere Erhöhung der Radioaktivität im Niederschlag.
Mit Antiserum gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase ist also ein quantitativer Nachweis des cytoplasmatischen Isoenzyms möglich.
Der Verlauf der Titration von mitochondrialer Malatdehydrogenase mit Antiserum gegen cytoplasmatisches Isoenzym ist in Abbildung 13 dargestellt. Zugabe von Antiserum zu mitochondrialem Isoenzym führt weder zu einer nennenswerten Abnahme der Enzymaktivität im Überstand noch zum Auftreten eines radioaktiv markierten Präzipitates.

3.10. Ausschluß einer Copräzipitation radioaktiv markierter Fremdproteine

Hefezellen wurden 6 Stunden lang dereprimiert und während dieser Zeit mit ^{14}C-Leucin markiert (siehe 3.5.). Rohextrakt aus diesen Zellen wurde mit steigenden Mengen Antiserum titriert. Dabei verringerte sich die im Überstand enthaltene Enzymaktivität nach Zusatz von 100 µl Antiserum von 0,55 U/ml auf 0,07 U/ml. Die verbliebene Restaktivität (13 %) ist auf die mitochondriale Malatdehydrogenase zurückzuführen (siehe 3.3.). Die im Überstand verbleibende Malatdehydrogenase-Aktivität und die im Niederschlag zu findende Radioaktivität ist in Abbildung 14 dargestellt. Ein entsprechender Titrationsversuch wurde mit cytoplasmatischer Malatdehydrogenase durchgeführt, die über Dextranblau-Sepharose (siehe 3.6) angereichert worden war. Wie Tabelle 5 zeigt, war das Verhältnis von Radioaktivität zu ausgefällter Enzymaktivität in beiden Ansätzen nahezu identisch.

Tabelle 5: Titration des Rohextraktes und angereicherter cytoplasmatischer Malatdehydrogenase (nach 6 Stunden Derepression) mit Antiserum

	Aktiv. (U/ml)	ausgefällte Aktiv. (U/ml)	Ausgefällte Radioaktiv. (cpm)	Verhältnis ausgefällter Radioaktiv.: ausgefällter Enzymaktiv.
Rohextrakt	0,55	0,48	140	290
gereinigte cytopl.MDH	0,48	0,46	128	280

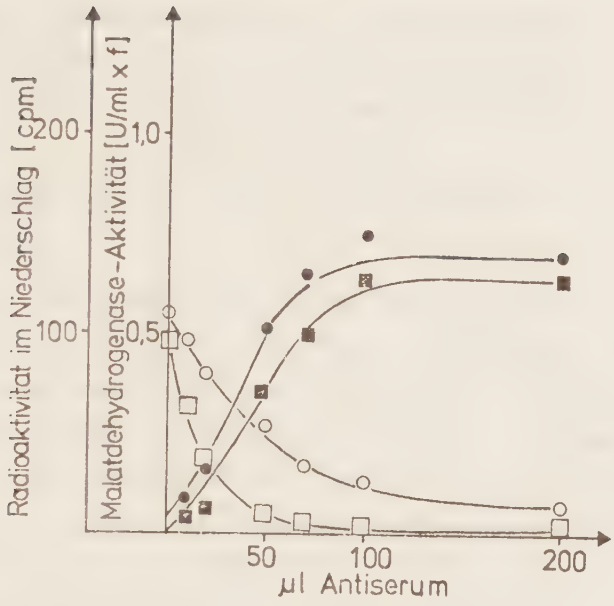

Abb. 14 Verlauf der Titrationskurven bei konstanten Mengen Rohextrakt bzw. angereicherter cytoplasmatischer Malatdehydrogenase mit variablen Mengen Antiserum

Rohextrakt (2.2.6.) und angereicherte Probe (2.2.10.4.) aus"dereprimierten"Zellen.
Versuchsdurchführung wie unter 2.2.17. beschrieben.

o—o Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts im Überstand

●—● Radioaktivität des Rohextrakts im Niederschlag

□—□ Angereicherte cytoplasmatische Malatdehydrogenase-Aktivität im Überstand

■—■ Radioaktivität der angereicherten cytoplasmatischen Malatdehydrogenase im Niederschlag

Dieses Ergebnis bestätigt, daß bei Titrationen mit Rohextrakt nur das der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase entsprechende Protein einen fällbaren Komplex mit dem Antiserum bildet. Ein Mitfällen anderer radioaktiv markierter Proteine konnte mit diesem Experiment ausgeschlossen werden.

Durch Anwendung der von SCHIMKE et al. (98) beschriebenen Rücktitrationsmethode wurde dieser Befund zusätzlich abgesichert. Zum Überstand der ersten Präzipitation von radioaktiv markiertem Rohextrakt mit Antiserum wurde unmarkiertes Enzym zugesetzt. Das zugegebene Protein wurde mit derselben Menge Antiserum präzipitiert wie im ersten Teil des Versuchs. Da keine Radioaktivität im Niederschlag gefunden wurde, konnte eine Mitfällung radioaktiv markierter Fremdproteine ausgeschlossen werden. Bei Titrationen von radioaktiv markiertem Rohextrakt mit Kontrollserum wurde keine Präzipitation festgestellt.

3.4. Versuch eines immunologischen Nachweises eines inaktiven cytoplasmatischen Malatdehydrogenase-Proteins nach der glucose-abhängigen Inaktivierung

In den Kapiteln 3.1. und 3.3. wurde gezeigt, daß die Aktivität der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase "dereprimierter" Zellen bei Überführung der Zellen in eine Glucose-Puffer-Lösung (Inaktivierungsmedium) stark abnimmt und daß diese Abnahme auf einer Inaktivierung des cytoplasmatischen Isoenzyms beruht. Zum Mechanismus dieser Inaktivierung sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Untersuchungen angestellt worden, die auf eine chemische Modifizierung oder einen proteolytischen Abbau hinweisen. Da bei einer chemischen Modifizierung die Primärstruktur des Proteins nicht verändert wird, führt sie im allgemeinen zu keinem Verlust der immunologischen Eigenschaft eines Proteins. Mit Hilfe eines Antiserums gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase sollte es daher möglich sein, ein modifiziertes Enzym zu präzipitieren und anschließend nach Isolierung mit dem nicht modifizierten Enzym strukturell zu vergleichen.
Bei Inaktivierung durch proteolytischen Abbau ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein Verlust der immunologischen Eigenschaften zu erwarten.
Der oben beschriebene radioimmunologische Test sollte eine Entscheidung zwischen diesen beiden Hypothesen ermöglichen.

Nach verschiedenen Zeiten der Inaktivierung wurden einer Zellsuspension Proben entnommen. Die Rohextrakte aus diesen Zellen wurden auf gleiche Proteinkonzentration (0,3 mg/ml) eingestellt und mit Antiserum titriert. Abbildung 15 zeigt die Abnahme der Enzymaktivität im Überstand und die Zunahme der Radioaktivität im Präzipitat im Verlauf der Titrationen. Die Titrationskurven zeigen, daß nur eine der ausgefällten Aktivität entsprechende Radioaktivitätsmenge im Niederschlag meßbar wird. Für den Fall, daß ein inaktives Enzymprotein durch Zusatz von Antiserum ebenfalls präzipitiert würde, wäre zu erwarten, daß die Radioaktivitätsmenge im Niederschlag in allen Ansätzen der im Ausgangswert (nach 6 Stunden Derepression) präzipitierten Radioaktivitätsmenge entspricht. Das Ergebnis des Versuches ist in Tabelle 6 zusammengefaßt. Das konstante Verhältnis der ausfällbaren Radioaktivität zu ausfällbarer Enzymaktivität (Tabelle 6, Spalte 4) zeigt, daß nur enzymatisch aktives Enzymprotein präzipitiert wird. Ein inaktives Protein der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase kann immunologisch nicht nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Es wurden je 1 ml der Rohextrakte aus verschiedenen Inaktivierungsstadien gleicher Protein-

konzentration (0,3 mg/ml) mit einer konstanten, schwach überschüssigen Antiserummenge versetzt. Die nach Zentrifugation im Überstand verbliebenen Antikörper wurden anschließend durch Zugabe von reiner cytoplasmatischer Malatdehydrogenase (1 U/ml) rücktitriert. Im ersten Schritt wurde nur die der im Rohextrakt enthaltenen cytoplasmatischen Malatdehydrogenase entsprechende Antikörpermenge ausgefällt. Im zweiten Schritt wurden steigende Mengen Enzymaktivität präzipitiert, entsprechend den nach der ersten Titration im Überstand verbliebenen steigenden Mengen an Antikörper. Die insgesamt ausgefällte Enzymaktivität blieb also in allen Ansätzen konstant. Dies zeigt, daß es nicht zur Ausbildung eines fällbaren Komplexes zwischen einem inaktiven Enzymprotein und dem Antiserum gegen cytoplasmatische Malatdehydrogenase kommt.

In einem entsprechenden Versuch mit dem weniger spezifischen Antiserum gegen mitochondriales Isoenzym konnte gezeigt werden, daß auch dieses Antiserum nicht mit einem inaktiven Enzymprotein reagiert (81).

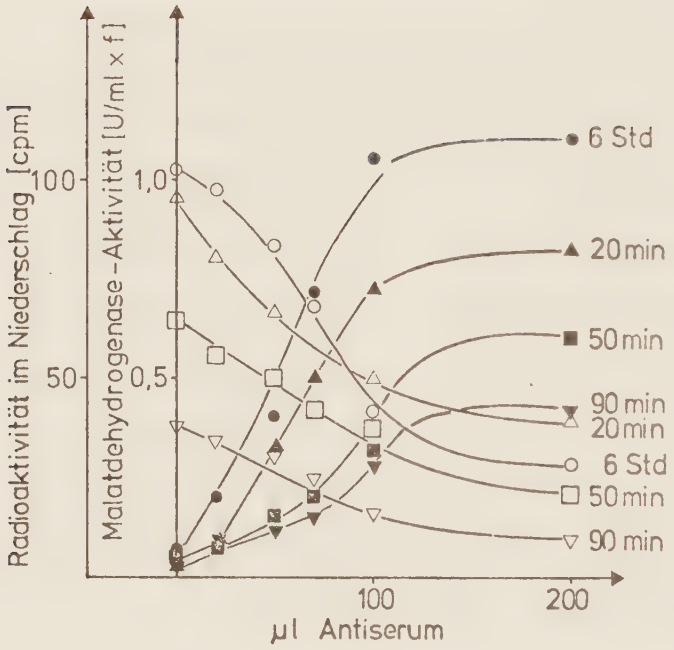

Abb. 15 Titration konstanter Mengen Rohextrakt gleicher Proteinkonzentration"derepr imierter" und "inaktivierter" Zellen mit variablen Mengen Antiserum

Versuchsdurchführung wie unter 2.2.17. beschrieben.

○ — ○ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 6 Stunden Derepression
● — ● Radioaktivität dieser Rohextrakte im Präzipitat
△ — △ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 20 Minuten Inaktivierung
▲ — ▲ Radioaktivität dieser Extrakte im Präzipitat
□ — □ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 50 Minuten Inaktivierung
■ — ■ Radioaktivität dieser Rohextrakte im Präzipitat
▽ — ▽ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 90 Minuten Inaktivierung
▼ — ▼ Radioaktivität dieser Rohextrakte im Präzipitat

Tabelle 6: Titrationen von Rohextrakten gleicher Proteinkonzentration (0,3 mg/ml) "derepr[illegible]imierter" und "inaktivierter" Zellen

	Enzym-aktivität (U/ml)	ausgefällte Enzymaktivität (U/ml)	ausgefällte Radio-aktivität (cpm)	Verhältnis ausgefällte Radioaktiv.: ausgefällte Enzymaktiv.
Derepression				
6 Std.	1,02	0,74	110	148
Inaktivierung				
20 Min.	0,95	0,56	82	146
50 Min.	0,64	0,43	60	139
90 Min.	0,38	0,28	42	150

3.12. Immuntitrationen von Rohextrakten gleicher Enzymaktivität

Die Ergebnisse des in Kapitel 3.11. beschriebenen Versuchs wurden durch den folgenden Versuch zusätzlich abgesichert. Für das Experiment wurden alle Rohextrakte aus "derepri-mierten" und "inaktivierten" Zellen auf gleiche Enzym-aktivität eingestellt. Dies hat zur Folge, daß die Menge der hypothetischen inaktiven cytoplasmatischen Malatdehydrogenase im Verlauf der Inaktivierung in den Ansätzen um ein Mehrfaches zunimmt. Die bei der Immun-titration ausfällbare Radioaktivität müßte erheblich ansteigen, wenn der Antikörper das inaktive Enzym prä-zipitieren würde. Außerdem müßte sich die im Überstand verbleibende Enzymaktivität gemäß dem steigenden An-teil an mitochondrialer Malatdehydrogenase erhöhen. Der Anteil des mitochondrialen Isoenzyms läßt sich aus Tabelle 3 in Kapitel 3.6. errechnen (siehe Tabelle 7, Spalte 2), da zur Trennung und Reinigung der Isoenzyme und für dieses Experiment dieselben Rohextrakte ver-wendet wurden.

Anders als erwartet, nahm die fällbare Enzymaktivität im Verlauf der Inaktivierung nur geringfügig ab (Abb. 16., Tabelle 7, Spalte 4). Diese Beobachtung steht im Wider-spruch zu den Ergebnissen von Versuch 3.6. Aufgrund einer geringen Unspezifität des Antiserums wurde ver-

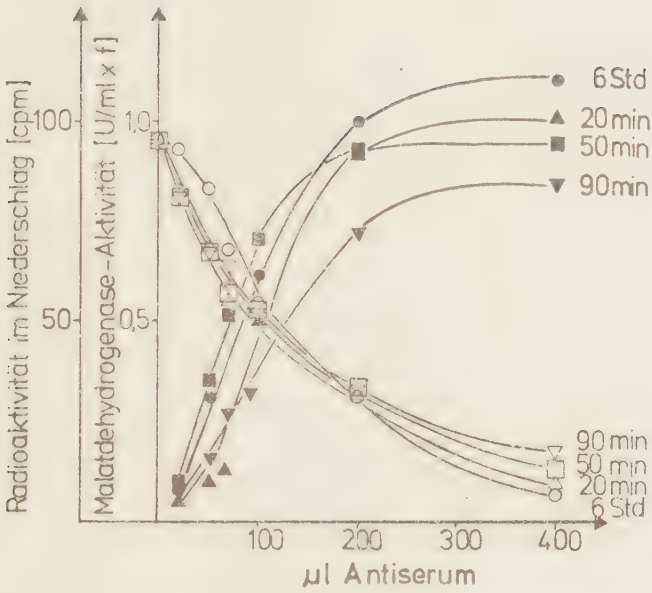

Abb. 16 Titration von konstanten Mengen Rohextrakt gleicher Enzymaktivität "dereprimierter" und "inaktivierter" Zellen mit variablen Mengen Antiserum

Versuchsdurchführung wie unter 2.2.17. beschrieben.

○—○ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 6 Stunden Derepression

●—● Radioaktivität dieses Rohextraktes im Niederschlag

△—△ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 20 Minuten Inaktivierung

▲—▲ Radioaktivität dieses Rohextrakts im Niederschlag

□—□ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 50 Minuten Inaktivierung

■—■ Radioaktivität dieses Rohextrakts im Niederschlag

▽—▽ Malatdehydrogenase-Aktivität des Rohextrakts von Zellen nach 90 Minuten Inaktivierung

▼—▼ Radioaktivität dieses Rohextrakts im Niederschlag

Tabelle 7: Titrationen von Rohextrakten gleicher Enzymaktivität (0,95 U/ml) "derepримierter" und "inaktivierter" Zellen

	Enzymaktiv. (U/ml)	errechnete mitochondriale Enzymaktiv. (U/ml)	errechnet ausfällbar cytoplasm. Enzymaktiv. (U/ml)	experimentell gefundene ausgefällte Enzymaktiv. (U/ml)	ausgefällte Radioaktiv. (cpm)	Verhältnis ausgefällter Radioaktiv.: errechneter ausfällbarer Enzymaktiv.
Derepression						
6 Std.	0,95	0,15	0,80	0,88	111	139
Inaktivierung						
20 Min.	0,95	0,26	0,69	0,87	101	146
50 Min.	0,95	0,35	0,60	0,82	95	158
90 Min.	0,95	0,41	0,54	0,78	85	157

mutlich ein Teil der mitochondrialen Malatdehydrogenase mitgefällt. Wie unter 3.9. erwähnt, wurde durch Veränderungen der Injektionsarten versucht, den Titer des Antiserums zu erhöhen. Möglicherweise hat das Antiserum hierbei seine ausgeprägte Spezifität verloren. Diese Tatsache ändert an der Aussagekraft des Versuches aber nichts, da das mitochondriale Isoenzym nur gering radioaktiv markiert ist.
Nach vollständiger Titration aller Ansätze mit Antiserum befinden sich, wie Abbildung 16 zeigt, vergleichbare Radioaktivitätsmengen in den Niederschlägen. Dies ist bei dem vorliegenden experimentellen Ansatz nur zu erwarten, wenn von den Antiseren kein inaktives Enzymprotein präzipitiert wird. Das Verhältnis von präzipitierter Radioaktivität zu errechneter präzipitierbarer Enzymaktivität ist wie im vorherigen Versuch innerhalb der Fehlergrenze wiederum gleich (Tabelle 7, Spalte 6).

Insgesamt schließen die in Kapitel 3.11. und 3.12. aufgeführten Ergebnisse die Möglichkeit der Isolierung eines enzymatisch inaktiven Enzymproteins der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase mit den hier beschriebenen immunologischen Methoden aus.

4. Diskussion

Die Derepression und Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase und zweier weiterer Enzyme der Gluconeogenese, Fructose-1,6-bisphosphatase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase ist, wie schon in der Einleitung ausgeführt, ein sinnvoller Adaptationsmechanismus zur Verhinderung schädlicher Reaktionswege (67). Da für die Regulation der Aktivitäten der drei Enzyme einige gemeinsame Merkmale gefunden wurden, wird derselbe Inaktivierungsmechanismus diskutiert. Diesem könnte möglicherweise erhebliche Bedeutung auch bei der Regulation anderer Enzyme zukommen.

Denkbare Mechanismen für die "Katabolit-Inaktivierung" oben genannter Enzyme sind:

1. effektorabhängige Änderung der Konformation und/oder der quartenären Struktur
2. enzymkatalysierte kovalente Modifizierung
3. begrenzte oder totale Proteolyse.

Nach NEEFF (79) läßt sich die cytoplasmatische Malatdehydrogenase durch Ausverdünnen, Gelfiltration oder Dialyse nicht reaktivieren. Deshalb kann angenommen werden, daß für die Inaktivierung kein reversibel wirkender Inhibitor verantwortlich ist. Als Regulationsmechanismus für die Inaktivierung kann daher die effektorabhängige Änderung in der Konformation weitgehend

ausgeschlossen werden.
Als weitere Möglichkeiten bleiben die enzymkatalysierte kovalente Modifizierung oder die Proteolyse.
Hinweise für das Vorliegen einer dieser Mechanismen bei der Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase sollten im Verlauf dieser Arbeit gewonnen werden.
Mit Hilfe immunologischer Studien sollte versucht werden, ein inaktives Enzymprotein nachzuweisen und zu isolieren. Ein Vergleich mit dem aktiven Enzym könnte Aufklärung über seine Struktur und den Inaktivierungsmechanismus geben.
Bereits früher war es gelungen, Antiseren gegen Isoenzyme der Malatdehydrogenase zu gewinnen (32, 53, 92). Mit Hilfe solcher Antiseren sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, ein inaktives Enzymprotein nachzuweisen. Für eine empfindliche Immuntitrationsmethode wurde das Antigen (cytoplasmatische Malatdehydrogenase) radioaktiv markiert. Die Markierung mit ^{14}C-Leucin erwies sich als geeignet, da das reine cytoplasmatische Isoenzym nach HÄGELE (34, 35) 61 Leucinreste pro Molekül besitzt und Leucin von der Zelle wenig metabolisiert wird. Aus radioaktiv markierten Rohextrakten verschiedener Inaktivierungsstadien und gleicher Proteinkonzentration wurde über eine Affinitätschromatographie an Dextranblau-Sepharose die cytoplasmatische Malatdehydro-

genase angereichert und vom mitochondrialen Isoenzym getrennt (Kapitel 3.6.).

Wenn ein inaktives cytoplasmatisches Enzym mitgereinigt werden würde, so müßte die in der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase-Fraktion gemessene Radioaktivitätsmenge über die Dauer der Inaktivierung gleich bleiben. Die Radioaktivität nahm aber parallel zur Enzymaktivität ab. Eine Anreicherung des hypothetischen inaktiven Enzymproteins zusammen mit der aktiven cytoplasmatischen Malatdehydrogenase kann somit eindeutig ausgeschlossen werden. Auch mit Hilfe der Gelelektrophorese (Kapitel 3.7. und 3.8.) ließ sich kein inaktives Enzymprotein in der Enzympräparation nachweisen. Die Hauptmenge der Radioaktivität ist der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase zuzuschreiben, die restliche Radioaktivität ist über das ganze Gel verteilt und keinem inaktiven Enzymprotein zuzuordnen.

Im weiteren wurde versucht, ein inaktives Enzymprotein mit Hilfe der Immuntitrationsmethode nachzuweisen. Durch Immunisierung mehrerer Kaninchen mit reiner cytoplasmatischer Malatdehydrogenase sollten spezifische Antiseren hergestellt werden. Jedoch wurden nur bei Injektion von nativem Enzym spezifische Antiseren erhalten. Eine Lagerung vor der Immunisierung (lyophilisiert oder tiefgefroren) verändert vermutlich die

Spezifität des Antikörpers geringfügig. Das Antiserum reagiert dann auch in geringem Maß mit der mitochondrialen Malatdehydrogenase. Die überlappende Spezifität des hier eingesetzten Antiserums hat auf die Schlußfolgerung aus den Ergebnissen dieser Arbeit keinen Einfluß. Da das mitochondriale Isoenzym bei der angewendeten Markierungsmethode nur wenig radioaktiv markiert ist, macht sich diese Radioaktivitätsmenge im Präzipitat nur geringfügig bemerkbar. Nach einem Elektrophoreselauf der angereicherten mitochondrialen Malatdehydrogenase ließ sich für die Proteinbande dieses Isoenzyms direkt keine Radioaktivität nachweisen. Die bei der Reinigung mit der mitochondrialen Malatdehydrogenase eluierte Radioaktivität muß also den an dieser Stelle mitdesorbierten Fremdproteinen zugeordnet werden.

Wenn eine chemische Modifizierung oder begrenzte Proteolyse der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase zu einem strukturell veränderten, inaktiven aber noch präzipitierbaren Enzymprotein führt, so sollte in Rohextrakten durch Titrationen mit steigenden Mengen spezifischen Antiserums das inaktive Enzym vom Antiserum ebenfalls präzipitiert werden. Rohextrakte verschiedener Inaktivierungsstadien wurden in einem Versuch auf gleiche Proteinkonzentration eingestellt. Bei Mitfällung eines inaktiven Enzyms sollte die in den Präzipitaten

gemessene Radioaktivität konstant sein. In einem anderen Versuch wurden die verschiedenen Rohextrakte auf gleiche Enzymaktivität eingestellt. Dies ließ bei Mitfällung des inaktiven Enzyms eine Zunahme der Radioaktivität im Niederschlag erwarten.
Tatsächlich ergab sich in beiden Versuchen eine Abnahme der Radioaktivitätsmenge im Niederschlag parallel zur Abnahme der ausfällbaren Malatdehydrogenase-Aktivität (Kapitel 3.11. und 3.12.).
Ein inaktives Enzymprotein wird folglich vom Antikörper nicht mitpräzipitiert.
Auch durch Nachtitration war es jedoch nicht auszuschließen, daß sich ein löslicher Komplex des inaktiven Enzyms mit dem Antikörper bildet. Das inaktive Enzym könnte nach Zugabe von weiterem aktiven Enzym aufgrund einer geringeren Bindungskonstante sofort wieder aus der Bindung mit dem Antikörper verdrängt werden.
In vitro (79, 92) und in vivo (18,104) läßt sich das cytoplasmatische Isoenzym irreversibel inaktivieren. Das in vitro inaktivierte Enzym zeigte Antigeneigenschaften.
Da es aber nur bei sehr hohen Konzentrationen von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyridoxalphosphat zu einer Inaktivierung kommt, ist diese Art der Inaktivierung vermutlich ohne biologische Bedeutung. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsergebnisse sprechen dafür,

daß die cytoplasmatische Malatdehydrogenase bei der Inaktivierung in vivo strukturell stärker verändert wird als in vitro. Bei Phosphorylasen und Glutaminsynthetase aus E. coli (45, 47) konnte nach Inaktivierung ein inaktives Enzym identifiziert werden. Für die letztgenannten Enzyme wird als Inaktivierungsmechanismus eine enzymkatalysierte Modifizierung postuliert.
Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, d.h. keine Bildung eines immunologisch nachweisbaren inaktiven Enzymproteins und Irreversibilität der Inaktivierung ist die kovalente chemische Modifizierung als alleiniger Mechanismus für die Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase unwahrscheinlich. Allerdings ist denkbar, daß das Enzym zunächst chemisch modifiziert und anschließend schnell proteolytisch abgebaut wird. Eine solche chemische Modifizierung läßt sich mit den in dieser Arbeit beschriebenen Titrationsversuchen nicht nachweisen.
Für den Mechanismus der Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase kann ebenso wie für einige andere Enzyme (7, 13, 16, 26, 48, 51, 52, 54, 57, 96, 99) ein proteolytischer Abbau postuliert werden. Die Beteiligung einer spezifischen Proteolyse bei der Regulation der Aktivität dieser Enzyme konnte noch in keinem Fall bewiesen werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsergebnisse liefern jedoch starke Evidenzen

für eine Regulation der Aktivität der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase durch spezifische Proteolyse. Proteolytische Aktivitäten treten in Hefezellen generell dann auf und nehmen zu, wenn diese in einem verarmten Medium inkubiert werden (4, 8, 9, 36, 57, 70). Die Protein-turn-over-Rate ist bei vielen Mikroorganismen unter wachstumshemmenden Bedingungen (51, 68), bei sporulierenden Bakterien (69) und bei Schimmelpilzen (103) hoch. Gegenwärtig wird versucht, die Turn-over-Rate der Malatdehydrogenase zu bestimmen. Wie in Vorversuchen in dieser Arbeit (Kapitel 3.5.) gezeigt wurde, geben die Zellen einen Teil (3 - 8%) der intrazellulären Radioaktivität im Laufe der Inaktivierung ins Medium ab. Weiterführende Versuche von ESSIG (22) zeigten, daß die im Medium auftretende Aktivität peptidgebunden ist. Die Versuche lassen den Schluß zu, daß nach Glucosegabe umfangreiche Ab- und Umbauvorgänge in der Zelle stattfinden, deren Reaktionsprodukte teilweise ins Medium abgegeben werden. Vermutlich unterliegen zahlreiche Enzyme einer proteolytischen Katabolit-Inaktivierung.

Für die Tryptophansynthetase aus Hefe (7, 26, 57, 70), für die Fructose-1,6-bisphosphatase (76), für die Chitinsynthetase (13) und für die Galaktosidase (108) wurden spezifische Faktoren gefunden, die für die In-

aktivierung dieser Enzyme in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen verantwortlich sind (1).
Für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase konnte schon früher eine hohe Sensitivität gegen zwei der bis dahin bekannten Endoproteinasen gezeigt werden (55, 79, 80). Um zu entscheiden, ob die Degradation durch eine neusynthetisierte spezifische Proteinase oder durch die in der Zelle normalerweise vorhandenen proteolytischen Systeme hervorgerufen wird, wurde von NEEFF (82) Versuche mit einer temperatursensitiven Mutante (39) durchgeführt. Dabei konnte die Neusynthese einer spezifischen Proteinase ausgeschlossen werden. Für die Inaktivierung müssen also bereits in "dereprimierten" Zellen vorliegende Proteasen verantwortlich sein. Dies spricht für das von HOLZER (49)aufgestellte Modell der"Katabolit-Inaktivierung" (Abb. 17). Glucose und/oder eng verwandte Zucker und Katabolite selektionieren einen Effektor, der einen Wechsel in der Konformation der Primärstruktur der Enzyme bewirkt, so daß sie sensitiv für eine Autophagie werden. Es ist bis heute unbekannt, wie diese Selektionierung vor sich geht. Die proteolytische Degradation findet dann in den Vakuolen statt, in denen die Hefeproteinasen lokalisiert sein sollen (64, 65, 72, 97).

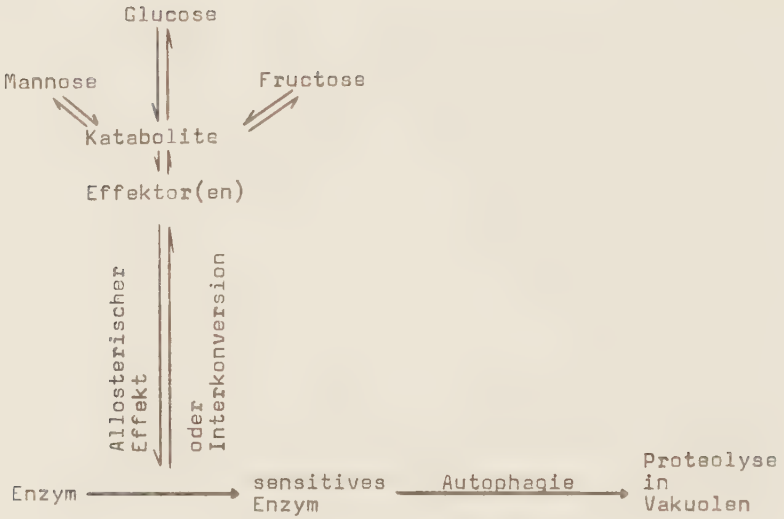

Abb. 17 Hypothetisches Schema für eine Katabolit-Inaktvierung in Hefe (49)

Die Spezifität der vakuolären Degradation läge nach diesem Modell im Transport der abzubauenden Proteine vom Cytoplasma in die Vakuolen.

In einigen Fällen sind Hinweise für die Energieabhängigkeit der "Katabolit-Inaktivierung" gefunden worden. Diese Energie könnte zur Aufnahme von Enzymen in die Vakuolen, analog zur Proteinaufnahme in die Lysosomen (42, 75) nötig sein.

Zur Klärung, ob die "Katabolit-Inaktivierung" durch Proteolyse bewirkt wird, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Eine indirekte Aussage ergäbe sich aus der Korrelation der Inaktivierungsgeschwindigkeit mit dem Auftreten von Spaltprodukten im Medium.

Eine Möglichkeit wäre die Isolierung von Vakuolen direkt nach Einleitung der Inaktivierung und die Suche nach einem radioaktiv markierten Enzymprotein bzw. nach markierten Bruchstücken.

Zur Aufklärung des Inaktivierungsmechanismus könnte ein Vergleich der Bruchstücke beitragen, die nach Inkubation gereinigter Hefeproteasen mit reiner cytoplasmatischer Malatdehydrogenase verschiedener Inaktivierungsstadien auftreten. Isolierung der Vakuolen (13, 17, 71) und Reinigungsverfahren für die Hefeproteasen (40, 41, 42, 62, 63, 76) sind bereits in der Literatur beschrieben.

3. Zusammenfassung

1. Cytoplasmatische und mitochondriale Malatdehydrogenase aus Saccharomyces cerevisiae wurden in einem Schritt über Dextranblau-Sepharose getrennt und angereichert.
2. Der Verlauf der Aktivitäten der Malatdehydrogenase-Isoenzyme während der Inaktivierung wurde mit Hilfe zweier Methoden - Ammoniumsulfatchromatographie an Celite und Affinitätschromatographie an Dextranblau-Sepharose - verfolgt.
3. Eine radioaktiv markierte cytoplasmatische Malatdehydrogenase wurde nach Wachstum der Zellen auf Acetat-Minimalmedium mit ^{14}C-Leucin gewonnen. Der Markierungsgrad dieses Isoenzyms wurde nach einer SDS-Disk-Gel-Elektrophorese mit Hilfe des Verbrennungsapparates bestimmt. Die Hauptmenge der Radioaktivität konnte dem cytoplasmatischen Isoenzym zugeordnet werden.
4. Ein inaktives Enzymprotein konnte weder nach Reinigung des radioaktiv markierten Rohextraktes an der Stelle des aktiven cytoplasmatischen Isoenzyms eluiert werden, noch konnte das inaktive Enzym auf der Elektrophorese als radioaktive Proteinbande identifiziert werden.
5. Eine radioaktiv markierte strukturell veränderte, inaktive cytoplasmatische Malatdehydrogenase konnte mit

Hilfe von immunologischen Methoden - Plattendiffusion, Radioimmunassay - nicht nachgewiesen werden.

6. Eine chemische Modifizierung als ausschließlicher Mechanismus für die Inaktivierung der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase scheidet mit hoher Wahrscheinlichkeit aus.

7. Für den Inaktivierungsmechanismus wird ein proteolytischer Abbau des cytoplasmatischen Isoenzyms postuliert.

6. Literaturverzeichnis

1. Afting, E.-G.; T. Katsunuma; H. Holzer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 103-110 (1972)
2. Amersham Buchler, Carrier free Selection, 1976
3. Baird, J.K.; R.F. Sherwood; R.J.G. Carr; A. Atkinson, FEBS Letters 70, 61-66 (1976)
4. Bakalkin, G.Ya.; S.L. Kal'nov; A.S. Zubatov, Biochem. (russ.) 41, 917-921 (1976)
5. Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse, 3rd ed., pp. 1241-1246, Verlag Chemie, Weinheim, 1974
6. Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse, 3rd. ed.,pp. 1545-1548, Verlag Chemie, Weinheim, 1974
7. Betz, H.; H. Hinze; H. Holzer, J. Biol. Chem. 249, 4515-4522 (1974)
8. Betz, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 121-130 (1976)
9. Betz, H.; U. Weiser, Eur. J. Biochem. 62, 65-76 (1976)
10. Böhme, H.J.; G. Kopperschläger; J. Schulz; E. Hofmann, J. Chromatogr. 69, 209-214 (1972)
11. Brissac, C.; M. Rucheton; C. Brunel; Ph. Jeanteur, FEBS-Letters 61, 38-41 (1976)
12. Brown, H.D.; T. Satyanarayana; H.E. Umbarger, J. Bacteriol. 121, 959-969 (1975)

13. Cabib, E.; R. Ulane; B. Bowers, J. Biol. Chem. 248 1451-1458 (1973)

14. Colora Meßtechnik GmbH; Ultraphor: Gerätebaubeschreibung und Bedienungsanleitung 1972

15. Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427 (1964)

16. Doi, R.H. in Current Topics in Enzyme Regulation (eds. Horecker, B.L.; E.R. Stadtman) vol. 6 pp. 5-20, Academic Press, New York, 1972

17. Dürr, M.; T. Boller; A. Wiemken, Arch. Microbiol, 105, 319-328 (1975)

18. Duntze, W.; D. Neumann; H. Holzer, Eur. J. Biochem. 3, 326-331 (1968)

19. Duntze, W.; D. Neumann; J.M. Gancedo; W. Atzpodien; H. Holzer, Eur. J. Biochem., 10, 83-89 (1969)

20. Ephrussi, B.; P.P. Slonimski; Y. Yotsuyanagi; J. Tavlitzki, C.R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol. 26, 87-99 (1956)

21. Epps, H.M.R.; E.E. Gale, Biochem. J. 36, 619-623 (1942)

22. Essig, U., persönliche Mitteilung

23. Feinberg, J.G., Nature 178, 1406 (1956)

24. Feinberg, J.G.,Int. Arch. Allergy & Applied Immun. 11, 129-152 (1957)

25. Ferguson, J.J.; M. Boll; H. Holzer, Eur. J. Biochem. 1, 21-25 (1967)

26. Ferguson, A.R.; T. Katsunuma; H. Betz; H. Holzer, Eur. J. Biochem. 32, 444-450 (1973)

27. Gancedo, J.M.; C. Gancedo, Arch. Mikrobiol. 76, 132-138 (1971)

28. Gancedo, C., J. Bacteriol.107, 401-405 (1971)

29. Gancedo, C.; K. Schwerzmann; J. Molano, Proc. Fourth International Symp. on Yeasts, Vienna 1974, Part I, p. 9. A5, 1974

30. Gancedo, C.; K. Schwerzmann, Arch. Microbiol. 109, 221-225 (1976)

31. Görts, C.P.M., Biochim. Biophys. Acta 184, 299-305 (1969)

32. Guzinski, G., Dissertation der Med. Fakultät der Universität Freiburg, 1975

33. Haarasilta, S.; E. Oura, Eur. J. Biochem. 52, 1-7 (1975)

34. HÄGELE,E. Dissertation der Chem. Fakultät der Universität Tübingen, 1977

35. Hägele, E.; J. Neeff; D. Mecke, Eur. J. Biochem., in Druck (1977)

36. Hansen, R.J.; R.L. Switzer; H. Hinze; H. Holzer, Biochim. Biophys. Acta 496, 103-114 (1977)

37. Harris, W.; J.J. Ferguson, Fed. Proc. 26, 678 (1967)

38. Harris, C.E.; D.C. Teller, J. theoret. Biol. 38, 347-362 (1973)

39. Hartwell, L.H.; C.S. Mc Laughlin, Biochem. 62, 468-474 (1968)

40. Hata, T.; R. Hayashi; E. Doi, Agr. Biol. Chem. 31, 150-159 (1967)

41. Hayashi, R.; Y.Oka; T.Hata, Agr. Biol. Chem. 33, 196-206 (1969)

42. Hayashi, M.; Y. Hiroi; Y. Natori, Nat. New. Biol. 242, 163-166 (1973)

43. Heidelberger, M.; F.E. Kendall, J.Exp. Med. 55, 555-561 (1932)

44. Heil, A.; W. Zillig, FEBS Letters 11, 165-168 (1970)

45. Heilmeyer, L.; D. Mecke; H. Holzer, Eur. J. Biochem. 2, 399-402 (1967)

46. Heinzel, W., Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 66. Kongreß 636-637 (1960)

47. Holzer, H., Adv. Enzymol. 32, 297-326 (1969)

48. Holzer, H.; H. Betz; E. Ebner, Current Topics in Cellular Regulation 9, 103-156 (1975)

49. Holzer, H., TIBS 1, 178-181 (1976)

50. Jayaraman, J.; C. Cotman; H.R. Mahler, Arch. Biochem. Biophys. 116, 224-251 (1966)

51. John, P.C.L.; C.F. Thurston; P.J. Syrett, Biochem. J. 119, 913-919 (1970)

52. Jost, J.; E.A. Khairallah; H.C. Pitot, J. Biol. Chem. 243, 3057-3066 (1968)

53. Jox, E., Dissertation der Med. Fakultät Freiburg, 1975

54. Juni, E.; G.A. Heym, Arch. Biochem. Biophys. 127 89-100 (1968)

55. Jusic, M.; H. Hinze; H. Holzer, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 735-740 (1976)

56. Kabat, E.H.; M.M. Mayer, Experim. Immunchem. p. 85-90, C.C. Thomas Company, Springfield II, Ill. USA, 1961

57. Katsunuma, T.; E. Schött; S. Elsässer, H. Holzer, Eur. J. Biochem. 27, 520-526 (1972)

58. King, T.P. Biochem. 11, 367-371 (1972)

59. Kohlhaw, G.; W. Drägert; H. Holzer, Biochem. Z. 341, 224-238 (1965)

60. Kopperschläger, G.; W. Diezel; R. Treyer; S. Liebe; E. Hofmann, Eur. J. Biochem. 22, 40-45 (1971)

61. Laemmli, U.K., Nature 227, 680-685 (1970)

62. Lenney, J.F.; J.M. Dalbec, Arch. Biochem. Biophys. 120, 42-48 (1967)

63. Lenney, J.F.; J.M. Dalbec, Arch. Biochem. Biophys. 129, 407-409 (1969)

64. Lenney, J.F., Fed. Proc. 32, 659 (1973)

65. Lenney, J.F.; P. Matile; A. Wiemken; M. Schellenberg; J. Meyer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1378-1383 (1974)

66. Lowry, H.O.; N.J. Rosebrough; A.L. Farr; R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

67. Magasanik, B. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 249-254 (1961)

68. Mandelstan, J., Bact. Rev. 24, 289-308 (1960)

69. Mandelstan, J.; W.M. Waites, Biochem. J. 109, 793-801 (1968)

70. Manney, T.R., J. Bacteriol. 96, 403-408 (1968)

71. Matile, P.; A. Wiemken, Arch. Microbiol. 56, 148-155 (1967)

72. Matile, P., Automie van Leeuwenhock, J. Microbiol. Serol. Suppl. Yeast Symp. 35, 57-70 (1969)

73. Maurer, H.R.; Disc-Electrophoresis, p. 44, Walter de Gruyter, Berlin, 1971

74. Maxon, W.D.; M.J. Johnson, Ind. Eng. Chem. 45, 2554-2560 (1953)

75. Milman, G.; L.S. Portnoff; D.C. Tiemeier, J. Biol. Chem. 250, 1393-1399 (1975)

76. Molano; C. Gancedo, Eur. J. Biochem. 44, 213-217 (1974)

77. Monod, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes, Actualités Scientifiques et Industrielles, No. 911, Paris, Herman et Cie, 1942

78. Monod, J., Growth 11, 223-289 (1947)

79. Neeff, J. Dissertation der Biol. Fakultät der Universität Freiburg, 1973

80. Neeff, J.; A. Hasilik; D. Mecke, Abstracts of the 9th FEBS-Meeting, Budapest, p. 90, s.2s.5., published by the Hungarian Biochemical Society 1974

81. Neeff, J.; E. Hägele; J. Nauhaus; D. Mecke, 10th Intern. Congress of Biochem. Hamburg, 1976

82. Neeff, J., Hoppe Seyl. Z. f. Phys. Chemie 358, 1251 (1977)

83. Neidhardt, F.C.; B. Magasanik, Nature 178, 801-802 (1956)

84. Neumann, D. Dissertation der Med. Fakultät der Universität Freiburg, 1968

85. Ornstein, L., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964)

86. Ouchterlony, Ö, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507-515 (1948)

87. Ouchterlony, Ö., Arkiv Keni Mineral. Geol. 268, 1-9 (1949)

88. Pai, S.-H.; H. Ponta; H.-J-. Rahmsdorf; M. Hirsch-Kauffmann; P. Herrlich; M. Schweiger, Eur. J. Biochem. 55, 299-304 (1975)

89. Peterson, J.I.; F. Wagner; S. Siegel; W. Nixon, Anal. Biochem. 31, 189-203 (1969)

90. Peterson, J.I., Anal.Biochem. 31, 204-210 (1969)

91. Poll, K.W. van de; A. Kerkenhaar; D.H.J. Schamhart, J. Bacteriol. 117, 965-970 (1974)

92. Regula, A. Dissertation der Med. Fakultät der Universität Freiburg, 1974

93. Rijn, J. van; R. van Wijk, J. Bacteriol. 110, 447-484 (1972)

94. Robertson, J.J.; H.O. Halvorson, J. Bacteriol. 73, 186-198 (1957)

95. Ryan, L.D.; C.S. Vestling, Arch. Biochem. Biophys. 160, 279-284 (1974)

96. Saheki, T.; H. Holzer, Europ. J. Biochem. 42, 621-625, (1974)

97. Saheki, T.; H. Holzer, Biochim. Biophys. Acta 384, 203-214 (1975)

98. Schimke, R.T.; E.W. Sweeney; C.M. Berlin, J. Biol. Chem. 240, 322-331 (1965)

99. Schimke, R.T.; E.W. Sweeney; C.M. Berlin, J. Biol. Chem. 240, 4609-4620 (1965)

100. Solomonson, L.P.; Plant Physiol. 56, 853-855 (1975)

101. Spiegelmann, S.; R. Dunn, J. Gen. Physiol. 31, 153-173 (1947)

102. Spiegelmann, S.; J.M. Reiner, J. Gen. Physiol. 31, 175-193 (1947)

103. Sussman,; R.R. Sussman, Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19, 403-435 (1969)

104. Switzer, R.L., "The inactivation of microbial enzymes in vivo", Ann. Rev. Microbiol. (in Druck) 1977

105. Thompson, S.T.; K.H. Cass; E. Stellwagen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 669-672 (1975)

106. Thorne, C.J.R.; L.J. Grossman; N.O. Kaplan, Biochim. Biophys. Acta 73, 193-203 (1963)

107. Torrontegui, G. de; E. Palacián; M. Losada, Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 227-231 (1966)

108. Ullman, A.; F. Tillier; J. Monod, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3476-3479 (1976)

109. Vician, L.; G.H. Tishkoff, Biochim. Biophys. Acta, 434, 199-208 (1976)

110. Wahl, G.M.; S.H. Hughes; M.R. Capecchi, J. Cell. Physiol. 85, 307-320 (1974)

111. Ward, S.; D.L. Wilson; J.J. Gilliam, Anal. Biochem. 38, 90-97 (1970)

112. Weber, K.; M. Osborn, J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

113. Weber, K.; J.R. Pringle; M. Osborn, Methods in Enzymology 26, 3-27 (1972)

114. Wickerham, L.J.; U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. No. 1029 (1951)

115. Wienne, R.J.; M. van Sande; D. Karcher; A. Lowenthal; H.J. van der Helm, Clin. Chim. Acta 7, 750 (1962)

116. Witt, J.; R. Kronau; H. Holzer, Biochim. Biophys. Acta 118, 522-537 (1966)

117. Witt, J.; R. Kronau; H. Holzer, Biochim. Biophys. Acta 128, 63-73 (1966)

118. Wolfe, R.G.; J.B. Neilands, J. Biol. Chem. 221, 61-69 (1956)

Lebenslauf

	Jutta Nauhaus
geboren am	08.08.1948
in	Heide/Holstein
Ausbildung	
1955-1959	Volksschule in Kiel
1959-1968	mathem. naturwissenschaftl. Gymnasium in Kiel
Mai 1968	Abitur
1968-1969	Frauenfachschule d. Mathilde-Zimmer-Stiftung in Coburg, Abiturientenlehrgang
SS 1969 - SS 1974	Studium der Biologie in Kiel und Tübingen
April 1971	Vordiplom
Juli 1974	Diplom-Hauptprüfung in Biologie
Oktober 1974 - November 1977	Anfertigung der Dissertation - Untersuchungen zum Inaktivierungsmechanismus der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase aus Hefe - am Institut für Physiologische Chemie unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. D. Mecke und Herrn Dr. J. Neeff

Meine akademischen Lehrer waren:

in Kiel:	
Botanik	Reese
Chemie	Jura, Moudon
Physik	Lochte-Holtgreven
Zoologie	Schuster
in Tübingen:	
Biochemie	Frank, Guglielmi, Mecke, Weitzel, Weser
Botanik	Bünning, Mägdefrau, Metzner, Schwemmle, Zetsche
Chemie	Rau, Rüdorff, Suhr, Vibahn
Geologie	Kullmann, Lodemann, Neugebauer, Schönenberg Schumann, Seilacher
Humangenetik	Haberland, Ritter, Schmitt
Mathematik	Lorenz, Pracht, Schweizer
Mikrobiologie	Loeffler, Sander, Winkelmann, Zähner
Parasitologie	Grunewald, Kretschmar, Wenk
Physik	Krüger, Seiler
Zoologie	Grell, Harder, Kulzer, Leibenguth, Mickoleit, Möhres, Netzel, Neuweiler, Riedel, Schwartz

Bönecke-Druck 3392-Clausthal Z. 29